



Étude de la fragmentation de molécules d'intérêt biologique isolées et nano-solvatées induite par collision avec des ions multichargés et des particules neutres

Virgile Bernigaud

► To cite this version:

Virgile Bernigaud. Étude de la fragmentation de molécules d'intérêt biologique isolées et nano-solvatées induite par collision avec des ions multichargés et des particules neutres. Physique Atomique [physics.atom-ph]. Université de Caen, 2009. Français. NNT: . tel-00461627

HAL Id: tel-00461627

<https://theses.hal.science/tel-00461627>

Submitted on 5 Mar 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de Caen
Basse-Normandie

UNIVERSITÉ de CAEN / BASSE-NORMANDIE

U.F.R. DES SCIENCES

ECOLE DOCTORALE S.I.M.E.M.



T H E S E

présentée par

Virgile BERNIGAUD

et soutenue

le 27 août 2009

en vue de l'obtention du

DOCTORAT de l'UNIVERSITE de CAEN

Spécialité : Milieux dilués et optique fondamentale

(Arrêté du 07 août 2006)

Étude de la fragmentation de molécules d'intérêt biologique isolées et nano-solvatées induite par collision avec des ions multichargés et des particules neutres



MEMBRES du JURY

M. Paul-Antoine HERVIEUX, Professeur des universités, Strasbourg

(Rapporteur)

M. Arnaud LE PADELLEC, Maître de conférences, Toulouse

(Rapporteur)

M. Lamri ADOUI, Professeur des universités, Caen

M. Pierre DEFRANCE, Professeur, Université catholique de Louvain (Belgique)

M. Philippe MAITRE, Directeur de Recherche CNRS, Orsay

M. Bruno MANIL, Professeur des universités, Villetaneuse

M. Bernd HUBER, Ingénieur CEA, Caen

(Directeur de thèse)

*À Fabienne,
à mes parents.*

Remerciements

Ce mémoire de thèse est le résultat d'un travail de trois années de recherches mené au laboratoire CIMAP (anciennement CIRIL) dans le groupe Atomes Molécules Agrégats.

Je veux d'abord remercier, puisque l'occasion m'en est donnée, le Commissariat à l'Énergie Atomique ainsi que le Conseil Régional de Basse-Normandie pour m'avoir soutenu financièrement durant cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury, d'une part d'avoir accepté d'y participer et, d'autre part pour la mansuétude dont ils ont fait preuve en assistant à une soutenance au mois d'août. Que Messieurs Paul-Antoine Hervieux et Arnaud le Padellec trouvent également ici toute ma reconnaissance pour avoir relu ce manuscrit dans des délais particulièrement courts.

Je sais gré à Serge Bouffard, directeur du laboratoire CIMAP, de m'avoir permis de réaliser des recherches sur cette thématique nouvelle et originale que constituent les systèmes d'intérêt biologique. Je tiens également à associer à ces remerciements, Emmanuel Balanzat, directeur adjoint, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter sur de nombreux sujets de physique. Je conseille vivement, à l'étudiant en quête de bonnes idées, de se rapprocher de ce passionné de physique toujours prêt à vous sortir LA référence bibliographique qu'il vous faut.

La réussite d'une thèse nécessite également un directeur de thèse proche de son étudiant, avec lequel une réelle relation de confiance et de complicité s'installe au fur et à mesure. Sur ce point et sur de nombreux autres, je dois reconnaître que Bernd Huber a été, pour moi, un vrai modèle de gentillesse, de disponibilité, de rigueur scientifique et d'érudition, qui force naturellement l'admiration. En trois mots qui ne sauraient tout résumer : un grand merci !

Je souhaite remercier très chaleureusement Lamri Adoui pour son soutien indéfectible, sa grande disponibilité et son oreille attentive qui m'ont accompagné dans mes choix. Nos nombreuses discussions m'ont permis d'avancer sereinement dans mon travail de thèse. Qu'il sache combien j'ai apprécié sa confiance.

Généralement, l'encadrement des recherches n'est pas uniquement le fait du directeur de thèse. Bien souvent une autre personne y est associée. Elle explique le principe des expériences, enseigne la physique liée au sujet, apprend à faire un poster, à préparer une conférence, à utiliser les clés de 13 ... C'est cette personne qui distille au jour le jour une partie de son savoir. J'exprime donc ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Bruno Manil (puisque c'est désormais ainsi qu'on le nomme), que j'ai connu célibataire puis pacsé, locataire puis propriétaire, noctambule puis papa !

Ma reconnaissance va également à Patrick Rousseau, qui a rejoint le laboratoire au cours de cette thèse en tant que maître de conférences. Son implication dans la théma-

tique biomolécules, ses grandes compétences scientifiques, sa pédagogie, son dévouement et sa gentillesse ont rendu possible l'obtention de nombreux résultats présentés ci-après (notamment le premier faisceau de biomolécules avec la source électrospray). Que ces remerciements soient les témoins de notre amitié. Merci à Alicja pour ses nombreux encouragements lors de la rédaction. Je garderai tout particulièrement un bon souvenir de leur accueil amical.

Les résultats expérimentaux, réalisés à Caen et présentés dans cette thèse, n'auraient pu être obtenus sans l'aide précieuse de Laurent Maunoury et Fabien Noury qui ont préparé de nombreux faisceaux d'ions, parfois jusqu'à des heures indues. Merci pour leur disponibilité et leur persévérance.

Une part essentielle de la réussite d'une thèse provient également de l'ambiance générale qui règne au sein de l'équipe de recherches. A cet égard et à bien d'autres, je veux dire à Rémi Maissonny et Michaël Capron, combien j'ai apprécié de travailler avec eux. J'espère qu'ils me pardonneront de les avoir ruinés à la machine à café et qu'ils parviendront à se soigner de leur boulimie respective (technologique pour l'un, alimentaire pour l'autre...). Que ces quelques mots soient un clin d'oeil à notre complicité. Je leur souhaite bon courage pour la suite de leur thèse.

Merci à Jimmy Rangama, mélomane et pianiste à ces heures perdues, de m'avoir incité, par son amitié, à continuer mes études à Caen. Je repense à ces nombreuses soirées passées sur la table de mixage à peaufiner les enregistrements du groupe dont nous faisons partie.

Et plus généralement un grand merci :

- à tous les membres du groupe AMA (Atomes Molécules Agrégats) pour les nombreux conseils prodigués ;
- à l'équipe technique et tout particulièrement à Frédéric Ropars pour son aide précieuse dans la mise au point du commande-contrôle de la source électrospray et Jean-Marc Ramillon que j'ai trop souvent sollicité ;
- aux secrétaires Delphine Hasley, Linda de Baermaker et Christiane Malot pour l'ensemble du travail qu'elles ont accompli. Merci pour l'organisation irréprochable des conférences et des meetings ITSLEIF ;
- à l'ensemble des personnes du laboratoire, avec qui j'ai pu interagir ;
- à Hélène, ma maman, qui a eu le courage de relire le manuscrit dans sa totalité à la traque des fautes d'orthographe ;
- à celle qui a supporté trois années de célibat géographique et qui m'a toujours soutenu dans l'exigence de réaliser des travaux de qualité : à Fabienne ;
- et à vous, lecteurs, qui allez partager mon enthousiasme !

Table des matières

I	Le point sur la physique des molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse	1
1	Introduction à l'étude des biomolécules en phase gazeuse	3
1.1	Les biomolécules : définition, systèmes étudiés, nomenclature	5
1.1.1	Définition	5
1.1.2	Présentation des biomolécules étudiées	6
1.2	Méthodes expérimentales	7
1.2.1	Mise en phase gazeuse des biomolécules	7
1.2.2	Interaction entre ion multichargé et molécule	10
1.2.3	Sélection en masse de biomolécules chargées	13
1.3	Quelques résultats marquants	18
2	Approches théoriques	21
2.1	Introduction à la théorie	21
2.2	Méthodes de structure électronique <i>ab initio</i>	24
2.2.1	Différents niveaux de théorie	24
2.2.2	Différents types de base	27
2.2.3	Différents types de calcul	28
II	Expériences réalisées sur les biomolécules isolées	31
3	Fragmentation d'un système complexe d'intérêt biologique en phase gazeuse	33
3.1	Expériences réalisées avec des ions multichargés de basse énergie	34
3.1.1	Dispositif expérimental de Caen	34
3.1.2	Résultats et discussions	42
3.2	Expériences réalisées avec collisions dans un gaz d'atomes alcalins	57
3.2.1	Dispositif expérimental d'Aarhus	57
3.2.2	Résultats et discussions	61
4	Dépendance de la fragmentation vis-à-vis de l'isomérisation	71
4.1	Dissociation d' α - et de β -alanine induite par des ions multichargés de basse énergie	71
4.1.1	Dispositif expérimental du KVI	72
4.1.2	Analyse des données	75
4.1.3	Résultats expérimentaux	79

III	Expériences réalisées avec prise en compte d'un environnement biochimique	95
5	Agrégats de molécules d'intérêt biologique	97
5.1	Agrégats purs de nucléobases	98
5.1.1	Dispositifs expérimentaux	98
5.1.2	Comparaison entre molécules isolées et agrégats	100
5.1.3	L'apport des coïncidences	108
5.2	Agrégats mixtes de nucléobases	114
6	Influence de la complexation sur la fragmentation de la liaison N-C$_{\alpha}$	117
6.1	Dissociation du dipeptide alanine-lysine doublement chargé	118
6.1.1	Spectre de fragmentation du dication [AK+2H] ²⁺ isolé	119
6.1.2	Étude du dication [AK+2H] ²⁺ complexé par une molécule d'éther couronne	124
7	Effets de la nano-solvatation	129
7.1	Étude du dipeptide [GA+H] ⁺	130
7.1.1	Effets de l'hydratation	130
7.1.2	Effets de la présence d'autres solvants	134
7.2	Étude du tripeptide [AAA+H] ⁺	134
7.2.1	Effets de la présence de méthanol	134
7.2.2	Interprétation des résultats	138
IV	Développements techniques : mises au point, réalisations et tests	143
8	Source electrospray	145
8.1	Origine et principe du dispositif	145
8.2	Mécanismes de formation, d'émission et de fission des gouttelettes	146
8.3	Description et réalisation de la source à Caen	149
8.3.1	Source electrospray	150
8.3.2	Quadripôle de sélection en masse	154
8.3.3	Alimentations pilotables et programme de commande	156
8.4	Premiers tests de fonctionnement	158
8.4.1	Production de biomolécules isolées et solvatées	158
8.4.2	Production d'agrégats d'eau protonnés	164
8.5	Optimisation du fonctionnement : perspectives	170
8.5.1	Amélioration instrumentale	170
8.5.2	Sensibilité d'une electrospray en fonction de la biomolécule	173
8.5.3	De l'importance du solvant	177
V	Annexes	181
	Bibliographie	183



Le point sur la physique des molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse

1

Introduction à l'étude des biomolécules en phase gazeuse

I.1

Sommaire

- 1.1 Les biomolécules : définition, systèmes étudiés, nomenclature
- 1.2 Méthodes expérimentales
- 1.3 Quelques résultats marquants

Erwin Schrödinger publiait, en 1944, un livre intitulé *What is life ?* [1] qui allait devenir l'un des écrits scientifiques les plus importants du XX^e siècle. Le grand mérite du physicien autrichien fut de montrer que le niveau moléculaire peut être considéré comme un niveau pertinent d'analyse, même pour ce qui relève de l'organisation des objets du monde du vivant. Dès lors que l'on considère une structure organisée, l'image habituelle de la physique et de la chimie est celle d'arrangements réguliers d'atomes ; le monde de la biologie étant, quant à lui, caractérisé par le mouvement, l'irrégularité, le changement. C'est en postulant une identité absolue des lois, qui régissent la mise en forme de la matière (qu'elle soit inerte ou vivante), que Schrödinger a montré qu'il était possible d'expliquer « à l'aide de la physique et de la chimie, les événements qui se produisent, dans l'espace et le temps, dans un organisme vivant ». En particulier, s'intéressant au support de l'hérédité, il a abouti à la notion de *crystal aperiodique*, c'est-à-dire à l'existence d'une structure hautement organisée, dont les éléments ne sont pas simplement répétés périodiquement, mais contiennent des motifs variables. Les biologistes, James Watson et Francis Crick reconnaîtront, par la suite, combien ces réflexions ont inspiré leurs propres recherches, qui ont abouti à la découverte de la structure et du mode de fonctionnement de l'ADN, en 1953 [2].

Il a fallu néanmoins de nombreuses années aux physiciens pour obtenir une vision satisfaisante des problèmes élémentaires qui conduisent à la formation des molécules, aidés en cela par des développements théoriques et expérimentaux conjoints et toujours plus pointus. L'évolution des théories de chimie quantique (voir chapitre 2) associées à des techniques expérimentales nouvelles, telles que des sources de production de molécules en phase gazeuse ou la spectrométrie de masse haute résolution, ont permis de mieux comprendre le comportement de ces objets. Lorsqu'elles sont arrivées à maturité, elles ont permis d'étudier des systèmes isolés de plus en plus complexes, des systèmes qui touchent, aujourd'hui, à la biophysique et à la biochimie.

Dès les années 90, un nombre grandissant d'études en phase gazeuse, a permis d'accroître notablement nos connaissances sur les structures précises et les propriétés des systèmes biomoléculaires isolés [3–5]. À l'époque de la génomique et de la protéomique, on peut s'interroger sur la pertinence de cette méthodologie qui peut sembler, au premier abord, trop réductrice. Il y a, en réalité, dans toutes les études de molécules isolées en phase gazeuse, la volonté commune de décrire, à l'échelle moléculaire, les propriétés intrinsèques des systèmes biomoléculaires. Des molécules, comme l'ADN ou les protéines, sont composées de nombreuses copies de petits blocs élémentaires constitués, entre autres, des acides nucléiques et des acides aminés. Ce sont ces petites molécules, liées par des liaisons covalentes, mais également engagées dans des liaisons faibles avec d'autres molécules voisines du milieu environnant (formation de complexes), qui sont à la base des capacités de reconnaissance moléculaire extraordinaires permettant l'existence de la vie.

La compréhension des propriétés intrinsèques des molécules d'intérêt biologique et des interactions entre ces constituants élémentaires est d'un intérêt considérable tant d'un point de vue scientifique que sociétal. La motivation radiobiologique des études portant sur les collisions entre les ions multichargés de basse énergie et les molécules biologiques en est un bon exemple. En effet, les études, portant sur l'interaction des rayonnements ionisants avec les systèmes d'origine biologique, sont justifiées par l'utilisation, de plus en plus fréquente, en médecine ou dans l'industrie, de faisceaux d'ions ou d'électrons, dans des buts thérapeutiques ou diagnostiques. La compréhension fine des processus induits nécessite alors une analyse poussée des interactions à l'échelle moléculaire. Or, la présence du milieu cellulaire et la complexité des molécules mises en jeu rendent extrêmement difficile l'extraction directe de ces informations. Dans ce contexte, les recherches effectuées en phase gazeuse permettent de séparer de façon univoque les propriétés intrinsèques des systèmes biomoléculaires, de celles induites par la présence d'un environnement. Depuis peu, il est possible de rendre compte précisément des effets provoqués par les toutes premières couches d'un environnement élémentaire, constitué d'autres molécules biologiques (agrégats) ou de molécules de solvant (systèmes nano-solvatés) [6].

L'objectif de ce travail de thèse était donc d'étudier les processus physiques fondamentaux, qui interviennent lors de la fragmentation de molécules d'intérêt biologique, résultant de l'impact avec un faisceau d'ions multichargé de basse énergie ou de la collision avec un gaz d'atomes alcalins. Ces expériences permettent une description de la phase physique de l'endommagement radio-induit.

Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit de thèse, nous allons préciser d'abord le terme de « biomolécule » qui sera utilisé par la suite. Nous définissons ensuite les systèmes que nous avons étudiés en précisant les aspects chimiques et biologiques nécessaires à la compréhension des résultats obtenus. Nous résumons enfin les méthodes expérimentales et la physique qui leur est liée, pour terminer brièvement par quelques résultats marquants, qui ont motivé ces travaux de recherche.

1.1 Les biomolécules : définition, systèmes étudiés, nomenclature

1.1.1 Définition

Le terme de « biomolécule » est aujourd'hui largement utilisé alors même qu'il n'en existe pas de définition officielle en langue française. Dans cette partie, nous proposons une définition qui tient compte des différentes acceptions que ce mot recouvre dans la communauté des physiciens et des chimistes intéressés par l'étude de tels systèmes.

Une définition communément admise consiste cependant à dire qu'une biomolécule est une molécule organique, qui est présente, produite, fabriquée ou transformée au sein d'un organisme vivant. Cette première définition n'est pas complètement satisfaisante. En effet, elle réduit la biomolécule à une molécule organique, c'est-à-dire à une molécule comportant au moins un atome de carbone. Même s'il est vrai que la quasi totalité des biomolécules est constituée d'un squelette carboné et de groupes fonctionnels caractéristiques des fonctions chimiques (par exemple de fonctions alcools, acides, amines, etc), cette approche exclut la molécule d'eau, solvant essentiel pour tous les organismes vivants connus. Par ailleurs, la notion même d'organisme « vivant » est équivoque et n'est donc pas appropriée à une définition générale des biomolécules. La difficulté à appréhender cette notion de « vivant » est particulièrement flagrante dans le cas des virus. Au cours des dernières années, les recherches effectuées sur de nouveaux virus (Mimivirus) a relancé le débat sur le caractère vivant ou inerte des virus [7]. La tendance à considérer les virus comme non vivants, basée sur le fait qu'ils n'ont pas de métabolisme¹ propre, est donc aujourd'hui remise en cause. Du point de vue du physicien ou du chimiste, il n'en reste pas moins que les virus constituent des systèmes biomoléculaires d'importance, d'autant plus qu'il est désormais possible de les étudier en phase gazeuse tout en s'assurant qu'ils conservent leur fonction biologique [8]. De ce fait, il paraît légitime d'inclure les molécules constituant de tels objets sous la dénomination générale de « biomolécules ». Ainsi, nous définissons très largement la biomolécule comme **une molécule qui participe aux processus biologiques d'un organisme du monde du vivant** (qu'il s'agisse de cellules animales ou végétales, de bactéries et même de virus). Le terme de biomolécule pourra ainsi être étendu à des molécules identiques à celles trouvées dans ces organismes, mais obtenues par d'autres moyens, par exemple dans les conditions qui prévalent dans l'espace ou dans des processus purement géophysiques. En conclusion, les expressions biomolécules, molécules d'intérêt biologique ou molécules biologiques, bien que n'étant pas rigoureusement identiques d'un point de vue sémantique, seront utilisées dans la suite de cette thèse avec le sens que nous venons de préciser.

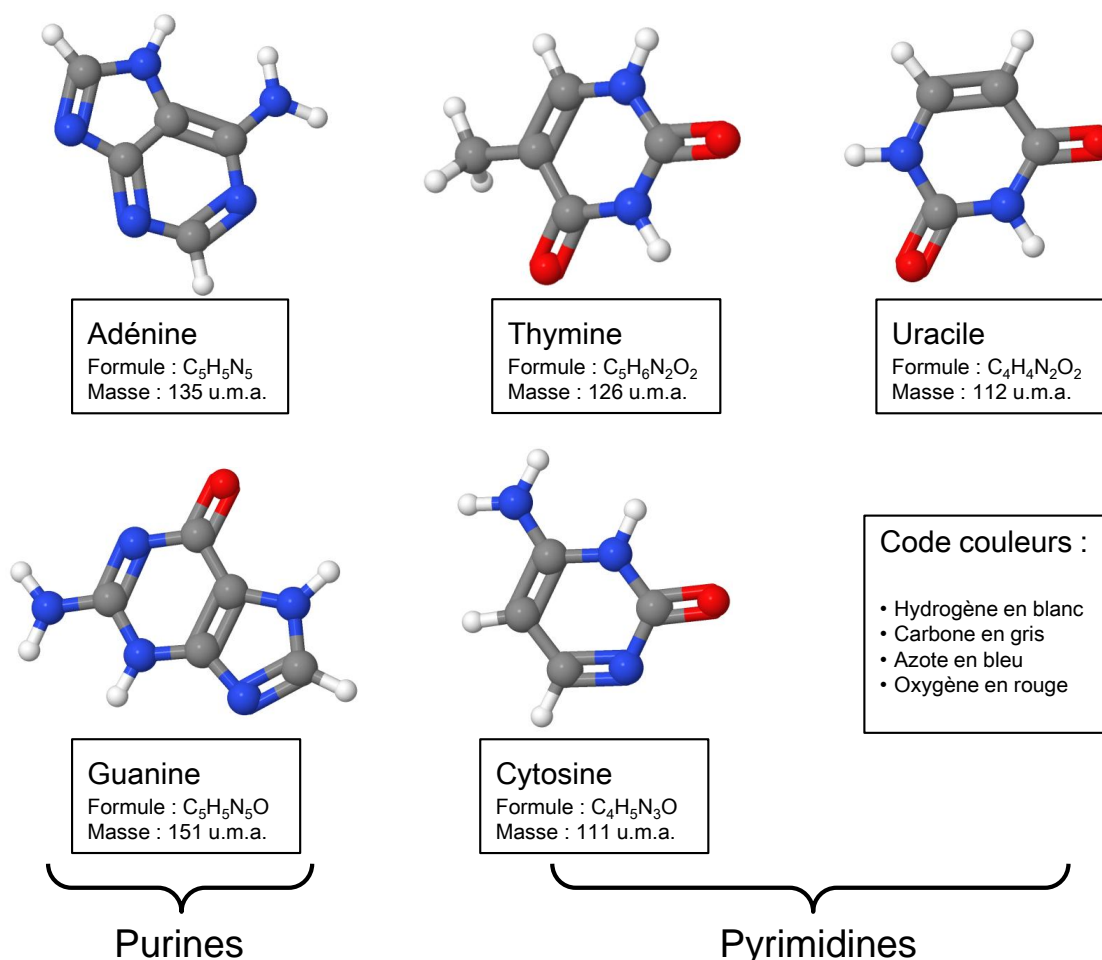


FIGURE 1.1 – Représentation en 3D des bases nucléiques de l'ADN et de l'ARN. La formule de ces molécules et leur masse (en unité de masse atomique) sont précisées en dessous de chaque base.

1.1.2 Présentation des biomolécules étudiées

Bases nucléiques

Parmi les objets d'étude de cette thèse, figurent les bases azotées également appelées bases nucléiques ou nucléobases. Il existe cinq molécules différentes dans l'ADN et l'ARN : l'adénine, la cytosine, la guanine, la thymine et l'uracile. On distingue les bases puriques et les bases pyrimidiques, comme cela est visible sur la figure 1.1.

Les molécules d'adénine, de cytosine, de guanine et de thymine sont la base des nucléotides impliqués dans la structure de l'ADN. Ces nucléotides sont constitués d'un groupe-ment phosphate, d'un sucre comportant cinq atomes de carbone (désoxyribose pour l'ADN) et d'une des quatre bases que nous venons d'évoquer. Dans le cas de la molécule d'ARN, seuls deux changements interviennent : le sucre devient un ribose et l'uracile remplace la thymine.

1. Le métabolisme correspond à l'ensemble des transformations moléculaires et énergétiques, qui se déroulent de manière ininterrompue dans une cellule ou un organisme.

La formation de liaisons hydrogènes entre paires de bases azotées est le mécanisme chimique par lequel la complémentarité des deux brins de l'ADN ou de l'ARN est rendue possible. L'appariement de deux bases azotées dans les molécules d'ADN ou d'ARN s'effectue par formation de paires dites de Watson-Crick [2] : l'adénine s'attache avec la thymine (ou l'uracile dans l'ARN) par la création de deux ponts hydrogènes, et la guanine s'attache avec la cytosine grâce à trois ponts hydrogènes.

Acides aminés et polypeptides

Les acides aminés sont des molécules organiques constituées d'une squelette carboné comportant deux fonctions caractéristiques : une amine (NH_2) et un acide carboxylique (COOH). Ils constituent les unités de base de la construction des protéines et diffèrent les uns des autres par leur chaîne latérale. Les propriétés (hydrophile/hydrophobe, neutre/-chargée, etc) de cette chaîne conditionnent l'établissement de liaisons, qui sont fondamentales du point de vue de la reconnaissance moléculaire. La figure 1.2 présente les 20 acides aminés les plus courants spécifiés par le code génétique.

L'enchaînement des acides aminés constitue la structure primaire des protéines. Ils sont reliés de manière covalente au moyen de fonctions amine et carboxylique, par la liaison appelée peptidique. Ainsi, l'élimination d'une molécule d'eau entre deux acides aminés conduit à la création d'un dipeptide et d'une liaison de type OC-NH (voir figure 1.3), où la distance entre le carbone et l'azote est égale à 0,133 nm. La portion de l'acide aminé, qui reste après la perte d'une molécule d'eau, lorsqu'il est lié à un autre acide aminé, est appelé résidu. Selon la longueur de la chaîne formée, la dénomination change. On appelle généralement peptide une chaîne comportant moins de 20 acides aminés et on parle de polypeptide, lorsque le nombre est compris entre 20 et 100, tandis qu'au dessus de cette valeur, il s'agit d'une protéine. Le processus de fabrication des protéines (traduction) se fait ainsi par ajouts successifs d'acides aminés. L'ordre dans lequel les acides aminés sont ajoutés est déterminé par le code génétique de l'ARN messager.

Remarquons que l'on nomme N-terminal, la partie d'un peptide comportant le groupement amine NH_2 et C-terminal celle se finissant par l'acide carboxylique COOH . La convention d'écriture pour les peptides ou les protéines consiste à placer la partie N-terminal, à gauche, et la partie C-terminal, à droite.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la molécule d'alanine, aux dipeptides d'alanine-lysine et de glycine-alanine, et enfin aux tripeptides d'alanine.

1.2 Méthodes expérimentales

1.2.1 Mise en phase gazeuse des biomolécules

La difficulté des études sur les systèmes d'intérêt biologique en phase gazeuse tient déjà à la fragilité des molécules lors de leur évaporation. Partant de ce constat, différents types

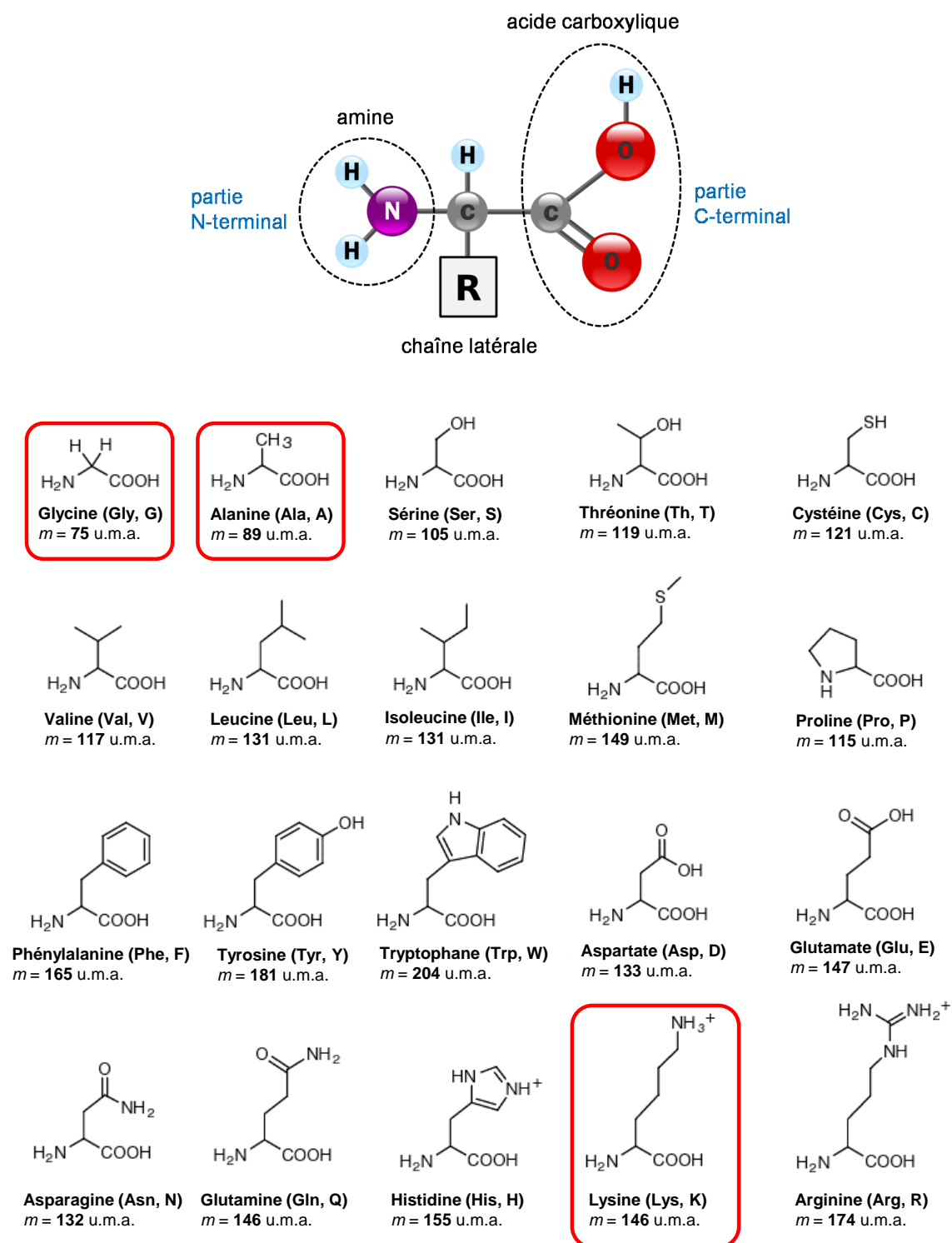


FIGURE 1.2 – Structure d'un acide aminé (en haut) et tableau des 20 acides aminés standard. En dessous de chaque molécule est indiqué son nom complet puis abrégé (qui sera utilisé dans la suite de la thèse) ainsi que sa masse en unité de masse atomique.

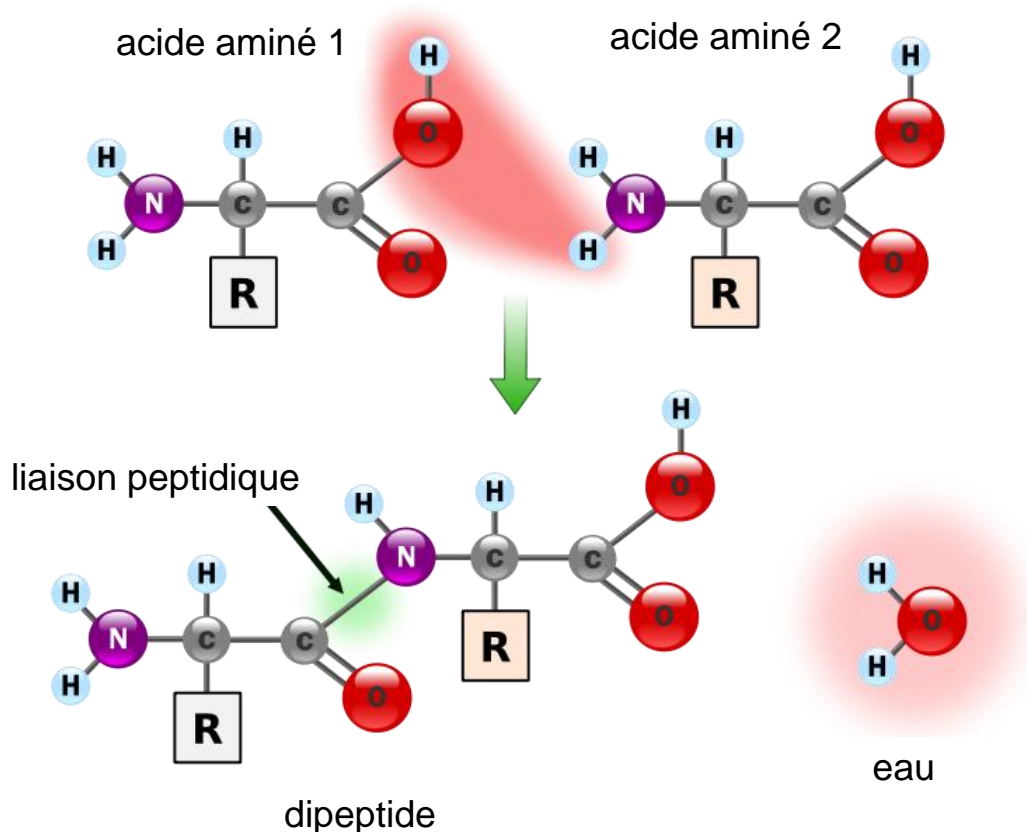


FIGURE 1.3 – Principe de formation de la liaison peptidique. La portion de l'acide aminé qui reste après la perte d'une molécule d'eau est appelé résidu.

de sources ont été mises en œuvre pour porter, en phase gazeuse, des biomolécules neutres ou chargées.

Parmi toutes les biomolécules disponibles, certaines peuvent simplement être chauffées afin d'obtenir une pression de vapeur saturante suffisante sans toutefois conduire à leur fragmentation. Par exemple, dans le cas des nucléobases, des tensions de vapeur compatibles avec la réalisation de collisions avec des ions multichargés sont obtenues pour l'adénine, la thymine, la cytosine et l'uracile. Par contre, la molécule de guanine nécessite le recours à des méthodes plus évoluées.

La technique de chauffage constitue ainsi la base de dispositifs expérimentaux plus développés dans lesquels on cherche, après la vaporisation, à limiter le nombre de conformères présents dans le faisceau de biomolécules produits. Dans ce but, les méthodes de jets supersoniques ou de dépôts de biomolécules sur des gouttelettes d'hélium [9] sont utilisées pour les espèces neutres. Il s'agit donc de méthodes de préparation des systèmes biomoléculaires neutres. Dans le cas de la technique du jet supersonique, Simons et coll. [10] ont montré que lorsqu'il s'agit de molécules particulièrement flexibles, des températures de l'ordre de 10-15 K pouvaient être atteintes. De plus, lorsque les barrières énergétiques² entre les différents conformères sont supérieures à 12-15 kJ/mol, la distribution de Boltzmann initiale est conservée lors de l'utilisation de cette méthode. Par contre, de façon tout à fait intéres-

2. On rappelle que la correspondance entre kJ/mol et eV est la suivante : 96.5 kJ/mol = 1 eV.

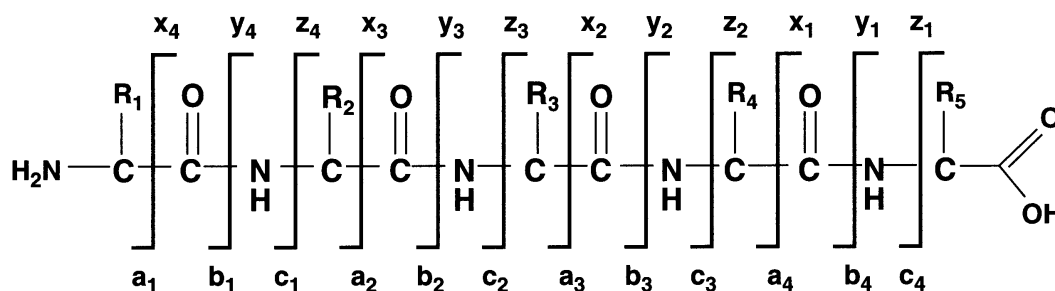


FIGURE 1.4 – Nomenclature conventionnelle des fragments formés suite à la cassure des liaisons du squelette d'un peptide.

sante, lorsque ces barrières sont inférieures à 5-6 kJ/mol, la relaxation collisionnelle permet d'amener le système moléculaire dans des conformations très proches de celles possédant l'énergie la plus faible.

Des biomolécules neutres ou ionisées peuvent également être directement introduites sous vide depuis la phase liquide. Pour ce faire, un jet liquide, contenant les biomolécules à étudier, est produit en injectant le liquide à travers un diaphragme de 10-20 μm à une pression de l'ordre de 10 à 100 bars, ce qui conduit à des flux de 10 à 100 m/s [11]. Le système biomoléculaire est ensuite éjecté du faisceau liquide au moyen d'impulsions laser infra-rouge excitant certains modes vibrationnels de la molécule (liaison C-O du méthanol à 9,66 μm , par exemple) [12]. Cette technique très douce permet l'étude de complexes non-covalents [13], mais nécessite d'utiliser des quantités importantes de biomolécules.

Une solution alternative est d'introduire sous vide des micro-gouttelettes grâce à l'utilisation d'un injecteur piézoélectrique dont le déclenchement est synchronisé avec un laser de désorption infra-rouge [14] ou ultra-violet [15]. Les gouttelettes sont soumises à une onde de choc et explosent, conduisant à la formation, en phase gazeuse, des biomolécules initialement contenues dans le solvant.

Enfin, nous évoquons deux techniques très connues de formation de biomolécules chargées : la méthode MALDI (*Matrix-Assisted Laser Adsorption Ionization*) et la technique electrospray. Concernant cette dernière, nous renvoyons au chapitre 8, dans lequel est précisément décrit la conception, l'assemblage et les tests de fonctionnement de la source electrospray réalisée pendant cette thèse. La technique MALDI, quant à elle, repose sur l'incorporation de biomolécules dans une matrice formée de petites molécules organiques [16] ou d'une poudre métallique très fine [17]. Un faisceau laser, généralement ultra-violet, délivrant des impulsions nano-secondes est envoyé sur la matrice et est absorbé provoquant l'éjection des biomolécules en phase gazeuse. Cette méthode, concurrente de l'electrospray, peut être utilisée pour une grande variété de systèmes biomoléculaires (peptides et oligonucléotides, par exemple).

1.2.2 Interaction entre ion multichargé et molécule

Les expériences, présentées dans cette thèse, nécessitent la compréhension des processus physiques liés à l'interaction d'ions multichargés de basse énergie avec des molécules. Après

une description générale de la collision, les mécanismes responsables de la capture, de l'ionisation et de l'excitation sont introduits avant d'évoquer la fragmentation.

Nous utilisons ci-dessous le système d'unités atomiques pour préciser le régime de vitesses des ions projectiles utilisés dans cette thèse. On rappelle que ce système revient à poser égales à 1 la constante de Planck réduite, la masse de l'électron au repos, et la constante issue de la loi de Coulomb : $e^2/4\pi\epsilon_0$ (où $-e$ est la charge de l'électron). Dans ce système, une vitesse d'une unité atomique (u.a.) correspond approximativement³ à $2,188 \times 10^6 \text{ m.s}^{-1}$.

Lors de la collision entre une particule chargée et une molécule, l'importance des mécanismes élémentaires d'interaction dépend principalement de la vitesse de collision par rapport à la vitesse des électrons de la cible. En particulier, dans le régime des hautes vitesses, pour lequel la vitesse de collision est beaucoup plus grande que celle des électrons, les processus d'ionisation et d'excitation de la cible atomique sont dominants.

Pour un projectile dont la gamme de vitesses est comprise entre 0,1 et 1 u.a., le temps d'interaction entre l'ion et la molécule est de l'ordre de 10^{-16} - 10^{-15} s, ce qui est beaucoup plus court que l'échelle de temps typique des vibrations de la molécule (10^{-13} - 10^{-12} s). Ainsi, lors de la collision, les fonctions d'ondes vibrationnelles et électroniques peuvent être découplées et l'approximation de Born-Oppenheimer (décrite plus en détail dans le chapitre 2 page 21) est applicable.

Dans le cadre des expériences d'interactions entre ions multichargés et biomolécules que nous avons réalisées, on peut considérer essentiellement deux étapes :

- la collision en elle-même, qui implique l'excitation de la cible biomoléculaire ou la création d'une ou de plusieurs lacunes électroniques par transfert de charges.
- la fragmentation de la biomolécule excitée ou ionisée. Le système biomoléculaire excité ou ionisé suit alors un certain schéma réactionnel en parcourant sa surface d'énergie potentielle. L'énergie déposée par le projectile lors de la collision joue ici un rôle prépondérant.

De nombreux travaux de recherche ont porté sur les collisions entre ions fortement chargés et petites molécules di- et tri-atomiques (H_2 , NO , CO_2) [18,19]. L'avantage dans l'étude de ces petits systèmes est la possibilité d'explorer et de comprendre en détail les processus collisionnels et la dynamique de la fragmentation. Une telle approche n'est pas réalisable dans le cas des systèmes biomoléculaires pour lesquels il est extrêmement compliqué de décrire les surfaces d'énergie potentielle multidimensionnelles.

Échange de charges

La première étape dans de telles collisions fait principalement intervenir le projectile et les électrons de la molécule. Compte tenu de l'échelle de temps caractéristique de l'interaction, les positions des noyaux restent inchangées. Toutes les transitions électroniques suivent alors le principe de *Franck-Condon* : la transition électronique intervient sans changement dans la position des noyaux. À cause de la grande différence de masse entre les

3. Pour référence, la vitesse de la lumière c est à peu près égale à 137 u.a..

électrons et les noyaux, les mouvements électroniques sont beaucoup plus rapides que ceux des noyaux. La transition sur un diagramme d'énergie potentielle est donc verticale.

Dans la gamme de vitesse utilisée pendant cette thèse, trois processus sont impliqués dans la collision : l'excitation de la cible biomoléculaire, l'ionisation et le transfert de charges. La prédominance de ces processus dépend du paramètre d'impact : pour les petits paramètres d'impact (collisions proches), l'ionisation multiple de la cible est attendue, alors que pour les grands paramètres d'impact (collisions plus distantes), le capture électronique (transfert de charges) est le processus le plus probable. Les deux processus sont généralement accompagnés par l'excitation de la cible biomoléculaire.

La collision entre un projectile A de charge q et une biomolécule BM peut laisser la molécule dans différents états, en fonction du type de collision. La collision peut conduire à une molécule excitée :



ou à une molécule chargée accompagnée de l'émission d'électrons :



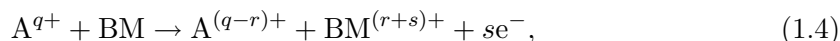
Il peut bien sûr s'agir d'une combinaison des deux processus.

Les collisions à grande distance sont caractérisées par un transfert de charges doux de la biomolécule cible vers le projectile dans un processus appelé capture électronique :



La capture électronique simple ou multiple a été intensivement étudiée dans les collisions entre ions et atomes. On peut ainsi citer le modèle *classical over-barrier* qui est largement utilisé comme approche du transfert de charges entre des ions et des atomes (ou des agrégats et des molécules). La difficulté de l'étude des biomolécules tient en ce qu'un grand nombre d'électrons intervient et qu'il est donc difficile d'appliquer des modèles simples comme celui-ci.

Ainsi, dans les expériences de collisions avec des ions multiplement chargés, l'ionisation et la capture se produisent en même temps, ce qui conduit à l'émission de multiples électrons. Ce phénomène est représenté, de façon générale, par l'équation :



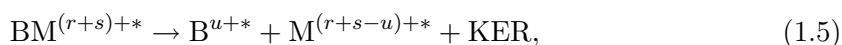
où r est le nombre d'électrons de la cible capturés par le projectile et s le nombre d'électrons émis dans le continuum lors de la collision.

Processus de fragmentation

Suite à la collision, le projectile laisse un ion biomoléculaire excité. Nous ne développerons pas l'excitation seule puisque partant d'une molécule neutre, elle ne conduit qu'à une espèce neutre qui n'est pas détectable expérimentalement.

Si l'énergie d'excitation induite par la collision est petite et que l'ion moléculaire n'est pas dans un état répulsif, un ion parent intact est finalement observé. Dans tous les autres cas, l'ion biomoléculaire excité va fragmenter, soit immédiatement, soit de façon retardée. L'échelle de temps typique des processus de dissociation est compris entre 10^{-12} et 10^{-6} s.

Le processus de fragmentation est accompagné d'une libération d'énergie cinétique (*KER : Kinetic Energy Release*). En partant de l'ion biomoléculaire produit dans l'équation 1.5, on a ainsi :



où $r + s$ correspondent aux électrons arrachés lors de la collision, u à la charge d'un des fragments et $r + s - u$ à celle de l'autre fragment. Un ion moléculaire comme $\text{BM}^{(r+s)+*}$ peut se désexciter par l'émission de fragments avec différents états de charge et différentes énergies cinétiques. L'énergie libérée lors de la dissociation est répartie sur l'ensemble des fragments, suivant la conservation de l'impulsion.

1.2.3 Sélection en masse de biomolécules chargées

Dans le cadre de ma thèse, j'ai été amené à développer un nouveau dispositif expérimental dédié à la production de biomolécules chargées en phase gazeuse, qui est détaillé dans le chapitre 8. La sélection en masse de ces particules est réalisée par l'intermédiaire d'un analyseur de masse quadripolaire. Nous précisons, ici, le principe de fonctionnement d'un tel appareil et renvoyons au chapitre 8 pour la description technique.

Analyseur de masse quadripolaire

Paul et Steinwedel ont proposé l'idée du quadripôle en 1953, alors qu'ils s'intéressaient à la conception d'un synchrotron pour électrons utilisant des champs radio-fréquences. Ils reçurent le prix Nobel de physique en 1989 pour le développement du quadripôle et du piège à ions [20].

L'analyseur est constitué de quatre électrodes de section cylindrique (théoriquement de section hyperbolique) parfaitement parallèles sur lesquelles sont appliqués des potentiels sinusoïdaux. Les ions ne passent à travers le dispositif que si leur rapport masse sur charge, que nous définirons, ici uniquement⁴, m/e (où m est la masse et e la charge de l'ion), vérifie certaines conditions. Les ions pénétrant dans l'analyseur ne possèdent que deux types de trajectoires : stables ou instables. Les ions possédant le rapport m/e souhaité suivent une

4. e n'est habituellement pas la charge de l'ion, mais celle de l'électron. Dans l'établissement des équations du quadripôle, nous avons impérativement besoin de recourir à la notation q pour les coordonnées, d'où la notation spéciale de la charge.

trajectoire stable, c'est à dire qu'ils ne touchent pas les parois du quadripôle, tandis que les autres ions suivent une trajectoire instable et sont perdus par collisions avec les électrodes.

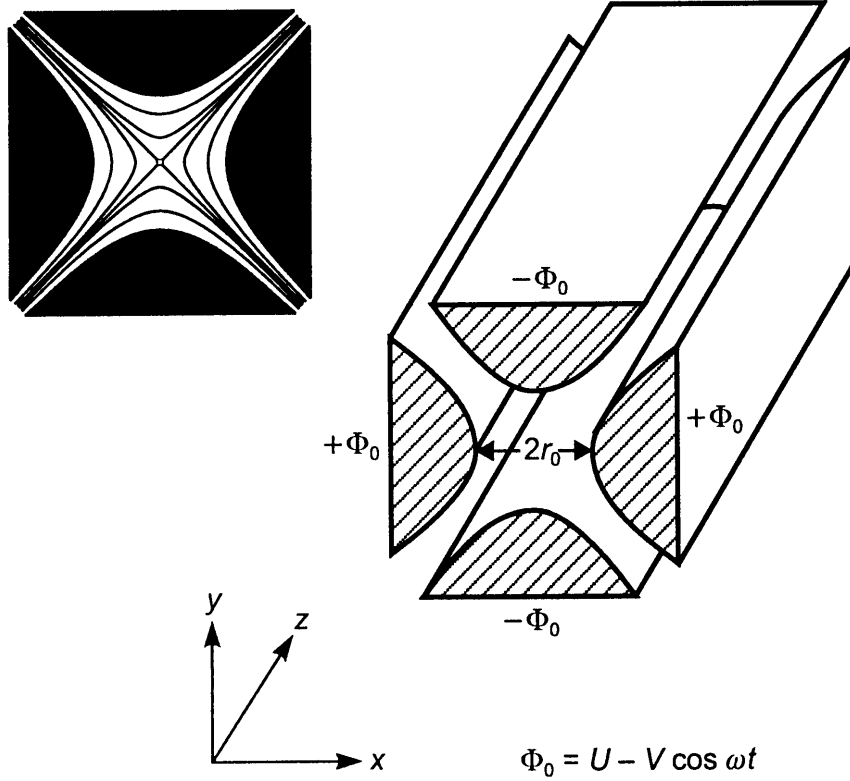


FIGURE 1.5 — Schéma du quadripôle avec des barres de section hyperbolique. Le potentiel appliqué sur les électrodes est noté ϕ (ϕ_0 correspond au signal électrique radio-fréquence envoyé sur les barres). En haut à gauche, sont représentées les lignes équipotentiellles.

Un ion qui entre dans le quadripôle suivant l'axe z (voir figure 1.5) subira un potentiel appliqué ϕ qui est de la forme :

$$\phi = \frac{\phi_0}{2r_0^2}(x^2 - y^2), \quad (1.6)$$

où $\phi_0 = U - V \cos(\omega t)$, $2r_0$ correspond à la distance inter-électrode, $\omega = 2\pi f$ est la pulsation (que l'on supposera constante) et f la fréquence en Hz.

En supposant qu'il n'y ait pas de charge d'espace entre les électrodes, le potentiel vérifie l'équation de Laplace : $\Delta\phi = 0$.

Le quadripôle est constitué de deux couples formés par les électrodes opposées. Sur le premier couple, le potentiel appliqué correspond à $+\phi$, alors que sur le second, le potentiel est égale à $-\phi$. La force, dépendante du temps, appliquée sur les ions permet de focaliser le paquet de façon alternative selon x et selon y .

Les équations du mouvement pour un seul ion sont données par la relation fondamentale de la dynamique :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{e}{mr_0}(U - V \cos(\omega t))x = 0, \quad (1.7)$$

$$\frac{d^2x}{dt^2} - \frac{e}{mr_0}(U - V \cos(\omega t))y = 0, \quad (1.8)$$

$$\frac{d^2z}{dt^2} = 0. \quad (1.9)$$

En posant les changements de variables suivants :

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{4eU}{m\omega^2 r_0^2}, \quad (1.10)$$

$$q_u = q_x = -q_y = \frac{2eU}{m\omega^2 r_0^2}, \quad (1.11)$$

$$\xi = \frac{\omega t}{2}. \quad (1.12)$$

La relation suivante apparaît :

$$\frac{a_u}{q_u} = \frac{2U}{V}, \quad (1.13)$$

et on peut écrire :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos(2\xi))u = 0, \quad (1.14)$$

où u représente les coordonnées x et y . L'équation 1.14 est l'équation de Mathieu dans sa forme canonique. Afin de comprendre le fonctionnement du quadripôle en mode « spectromètre de masse », il est nécessaire de connaître certaines propriétés des solutions de l'équation de Mathieu. Mathématiquement, ces dernières peuvent être exprimées sous la forme :

$$u(\xi) = \alpha' e^{\mu\xi} \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} e^{2in\xi} + \alpha'' e^{-\mu\xi} \sum_{n=-\infty}^{\infty} C_{2n} e^{-2in\xi}, \quad (1.15)$$

où α' et α'' sont des constantes d'intégration qui dépendent des conditions initiales. Les constantes C_{2n} et μ dépendent, quant à elles, des valeurs des paramètres a et q , mais pas des conditions initiales.

Une première propriété importante de l'équation de Mathieu est donc que la nature du mouvement de l'ion dépend uniquement des valeurs de a et de q (donc du rapport m/e à U , V , r_0 et ω fixés). Il n'existe que deux types de solutions de la forme 1.15, qui sont déterminées par la nature de la constante μ . Les solutions dites stables sont celles correspondant au cas où μ demeure fini lorsque ξ tend vers l'infini. Ce sont les solutions des trajectoires souhaitées dans le quadripôle pourvu que la valeur maximale de l'amplitude μ_{max} soit inférieure à la distance r_0 (distance de l'axe du quadripôle aux électrodes). Le second groupe de solutions est celui pour lequel μ augmente lorsque ξ tend vers l'infini, ces solutions sont dites instables.

Ainsi, la nature des solutions (stables ou instables) dépend uniquement des paramètres a et q . Mathématiquement, aux solutions sont associés des couples de paramètres (a, q) appelés points de fonctionnement. Pour chaque direction de l'espace (x et y), dans le plan (a, q) , il existe des régions dites de stabilité et d'instabilité. La superposition des diagrammes de stabilité des deux directions x et y permet d'obtenir les régions qui présentent

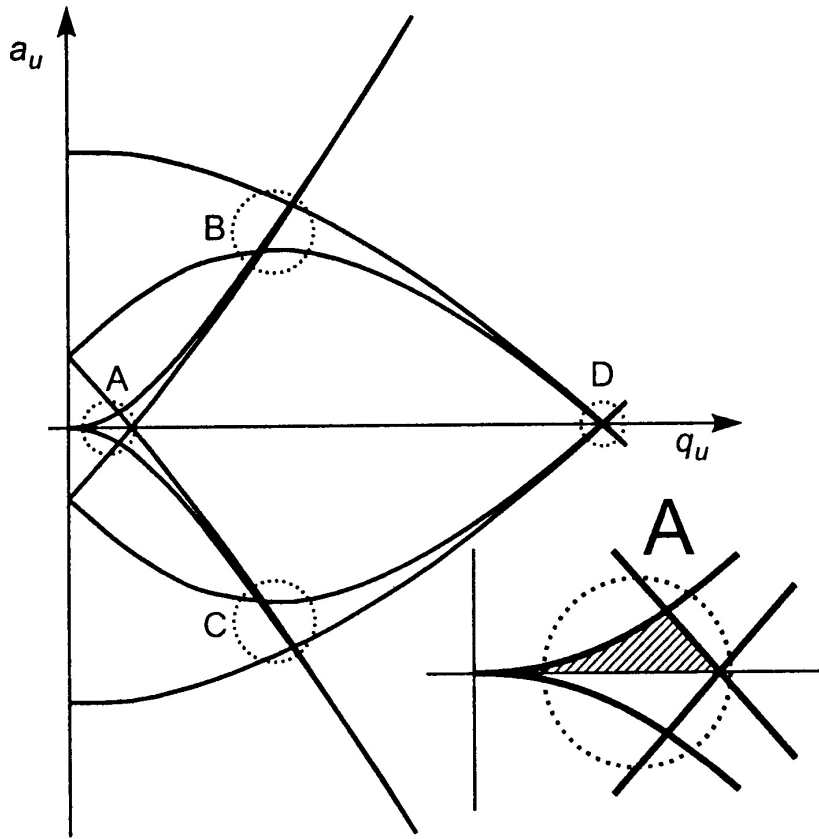


FIGURE 1.6 – Diagramme de stabilité des trajectoires d'un ion traversant le quadripôle. u représente indifféremment les coordonnées x et y . Les quatre régions de stabilité sont nommées A, B, C, D. La région A, qui est la plus utilisée est agrandie en bas à droite.

une stabilité dans les deux directions (A, B C et D sur la figure 1.6). Ces dernières correspondent aux points de fonctionnement permettant à l'ion d'avoir une trajectoire stable à travers l'analyseur. La première région de stabilité (Zone A sur la figure 1.6) est la plus fréquemment utilisée. Les couples (a, q) , qui définissent cette première région de stabilité, permettent d'obtenir une trajectoire stable. Pour un rapport m/e fixé, à l'aide des relations 1.10 et 1.11, il est possible de passer du diagramme de stabilité dans l'espace des (a, q) à celui dans l'espace des tensions (U, V) permettant ainsi de construire un nouveau diagramme de stabilité plus pratique pour l'expérimentateur. Pour chaque rapport m/e , il existe un diagramme de stabilité différent. Un exemple d'un tel diagramme est présenté pour trois masses différentes (la charge étant identique dans ces trois cas) sur la figure 1.7.

Ainsi, un balayage du rapport m/e est effectué en faisant varier simultanément U et V tout en conservant un rapport U/V constant, qui est déterminé en fonction de la résolution et la transmission souhaitées. Le pouvoir de résolution $m/\Delta m$ est donné par la relation suivante :

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{0,126}{0,16784 - \frac{U}{V}}. \quad (1.16)$$

Il dépend du rapport des tensions U et V . Lorsqu'un balayage à U/V constant est effectué,

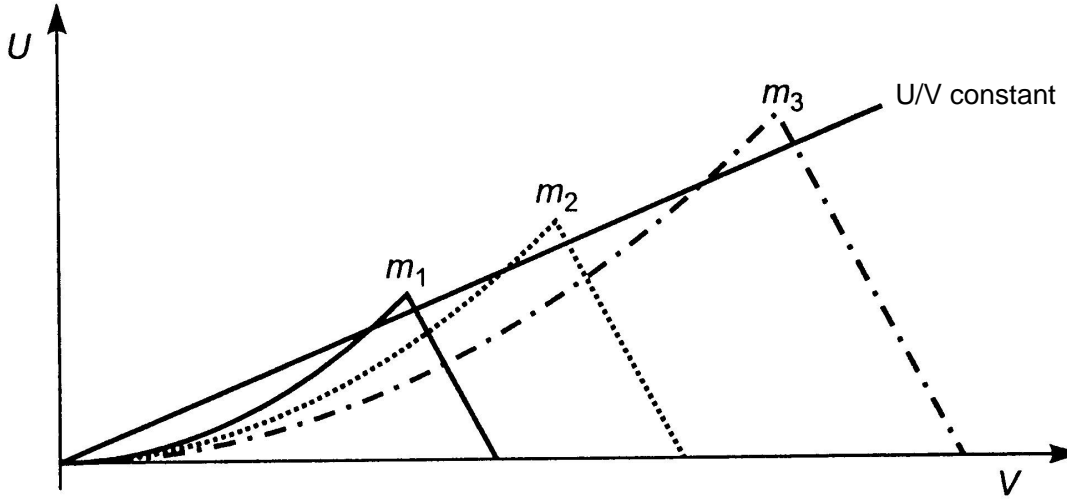


FIGURE 1.7 – Diagramme de stabilité dans l'espace des tensions \$(U,V)\$ pour trois masses différentes \$(m_1 < m_2 < m_3)\$. La droite de balayage (en noir) correspond aux valeurs prises par les tensions \$U\$ et \$V\$ en respectant la relation \$U/V = \text{constante}\$, pour permettre le passage d'ions de rapports \$m/e\$ différents.

la résolution est constante pour toute la gamme \$m/e\$ explorée. La résolution maximale d'un analyseur quadripolaire peut être estimée à l'aide de la relation suivante :

$$R_{\max} = \left(\frac{m}{\Delta m} \right)_{\max} = \frac{L^2 \omega^2 m}{8\pi^2 K E_z}, \quad (1.17)$$

avec \$L\$ la longueur des électrodes, \$K\$ une constante déterminée expérimentalement, \$E_z\$ l'énergie cinétique initiale des ions selon \$z\$.

La transmission du spectromètre \$T\$ est estimée par la relation ci-dessous :

$$T = \left(\frac{r_0}{D} \right)^2 \frac{\Delta m}{m}, \quad (1.18)$$

où \$D\$ est le diamètre du faisceau d'ion qui entre dans le quadripôle. On constate donc qu'une augmentation de la résolution entraîne une baisse de la transmission.

Par ailleurs, pour que la sélection soit efficace, il est nécessaire que les ions ayant un rapport \$m/e\$ incorrect évoluent suffisamment longtemps dans le champ quadripolaire afin d'être éjectés. Il en résulte qu'il existe une valeur maximale (en eV) pour l'énergie cinétique longitudinale (\$E_{l_{\max}}\$) des ions entrant :

$$E_{l_{\max}} < \frac{f^2 L^2}{25} \left(\frac{\Delta m}{m} \right) m, \quad (1.19)$$

où \$f\$ est la fréquence en MHz et \$L\$ en cm.

Enfin, il existe également la possibilité qu'un ion pénètre dans l'analyseur avec une distance par rapport à l'axe \$z\$ suffisamment élevée pour qu'il soit éjecté alors même qu'il possède le bon rapport \$m/e\$ et la bonne vitesse. Dans le cas d'ions injectés parallèlement à l'axe, la distance maximale \$d_{\max}\$ assurant qu'un ion ayant le bon rapport \$m/e\$ ne sera pas

éjecté est donnée par la relation :

$$d_{\max} = \frac{1}{2} m f^2 r_0^2 \left(\frac{\Delta m}{m} \right)^{1/2}. \quad (1.20)$$

De la même façon, on définit également une énergie transverse maximale, $E_{t_{\max}}$ (en eV) :

$$E_{t_{\max}} \approx \frac{1}{2} m f^2 r_0^2 \left(\frac{\Delta m}{m} \right). \quad (1.21)$$

Cette condition impose des contraintes sur la divergence du faisceau pénétrant dans l'analyseur de masse quadripolaire, contraintes que nous évoquerons dans le chapitre 8.

1.3 Quelques résultats marquants

L'étude de la fragmentation de biomolécules, en phase gazeuse, induite par des collisions avec des ions multichargés de basse énergie et des particules neutres est une thématique récente au laboratoire (2003). Cette thèse constitue donc la première thèse de l'équipe sur ce sujet, ce qui justifie de préciser brièvement certains résultats marquants qui ont motivé l'orientation vers ces recherches.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, la compréhension de l'origine des dommages, causés à la molécule d'ADN par les radiations ionisantes, constitue un enjeu majeur pour appréhender des conséquences biologiques d'une exposition à un rayonnement (proton- et hadron-thérapie, par exemple). Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'endommagement radio-induit des tissus biologiques, dans le but de clarifier les mécanismes et les phénomènes qui interviennent durant l'interaction de radiations de haute énergie sur les cellules vivantes [21, 22].

Par ailleurs, la réalisation d'expériences d'irradiation de morceaux d'ADN en solution et l'analyse des résultats par des méthodes biologiques et chimiques ont clairement montré que les conséquences les plus sévères des irradiations provenaient des dommages causés à la molécule d'ADN, et plus précisément de la production de cassures simple brin (*Single Strand Break*) et double brins (*Double Strand Break*) [23–25]. En particulier, c'est l'accumulation de ces lésions qui rend impossible toute réparation de la molécule support de l'information génétique [26].

Au début des années 2000, des travaux réalisés par le groupe de Chetoui [23, 27, 28] en collaboration, entre autres, avec des biologistes du CEA et de l'institut Curie ont mis en évidence le fait que les cassures simple et double brins pouvaient être attribuées à des processus physiques élémentaires, à l'échelle atomique, tels que l'ionisation en couche interne, suivie de désexcitations Auger.

Il convient également de mentionner le fait que l'endommagement des systèmes biologiques provient non seulement de l'impact direct des quanta de grande énergie du rayonnement, mais aussi pour une large part, de particules secondaires, telles que des électrons, des radicaux et des ions monochargés ou multichargés de basse énergie, formés dans la trace des

radiations primaires. Le groupe de Sanche a ainsi montré que des électrons de très basse énergie, bien inférieure au seuil d'ionisation des biomolécules impliquées, induisaient la cassure des brins d'ADN, à cause de processus d'attachement électronique dissociatif [29].

Enfin, en ce qui concerne les ions simplement et multiplement chargés de basse énergie (quelques keV), plusieurs expériences ont été effectuées sur les molécules de thymine, d'adénine et d'uracile [30–32]. Elles ont mis en évidence la dynamique de fragmentation des bases nucléiques, qui suit une excitation intense de leur cortège électronique, et qui est en partie dépendante des propriétés structurales des molécules.

C'est dans ce contexte, et avec la volonté d'étendre nos connaissances sur les effets de l'interaction de ce type de rayonnement avec des biomolécules, non seulement isolées, mais également, nano-solvatées, qu'a commencé le travail de thèse présenté dans ce manuscrit et dans lequel nous suivrons le plan suivant :

chapitre 2 : une première approche des modèles de chimie quantique appliquée à la détermination de la structure électronique des biomolécules est présentée. Nous détaillons quelques unes des théories qui ont été mises en œuvre dans des calculs destinés à permettre une première analyse des résultats issus des expériences que nous avons réalisées.

chapitre 3 : il s'agit d'une première étude sur des systèmes d'intérêt biologique isolés, portant plus précisément sur les molécules de porphyrine. Le chapitre est l'occasion d'introduire les dispositifs expérimentaux utilisés à Caen (France, ions multichargés de basse énergie) et à Aarhus (Danemark, collisions avec des particules neutres).

chapitre 4 : les résultats issus de collisions entre des ions multichargés de basse énergie et les molécules d' α - et de β -alanine sont exposés. En particulier, l'accent est mis sur l'éventuelle dépendance de la fragmentation vis-à-vis de l'isomérisation. Le dispositif expérimental de Groningen (Pays-Bas, ions multichargés de basse énergie) est également présenté.

chapitre 5 : nous présentons une étude portant sur un premier modèle de prise en compte de la présence d'un environnement biologique par l'intermédiaire de la formation d'agrégats de nucléobases.

chapitre 6 : l'utilisation d'une molécule d'éther couronne permet de contraindre, par la création d'un complexe, certaines voies de dissociation du dipeptide d'alanine-lysine. Les résultats obtenus, suite à des collisions dans un gaz d'atomes alcalins, permettent d'affiner notre compréhension des mécanismes de fragmentation de la liaison N-C $_{\alpha}$ induite par capture électronique.

chapitre 7 : nous étudions les effets de la présence de molécules d'eau et d'autres molécules de solvants attachées à un di- puis tri-peptide sur la dissociation induite par capture électronique.

chapitre 8 : il concerne la réalisation d'un dispositif expérimental dédié à la production, en phase gazeuse, de biomolécules chargées sélectionnées en masse. Ce développement

technique, entièrement réalisé pendant la thèse, est basé sur une source electrospray permettant de conserver des espèces solvatées et un analyseur de masse quadripolaire.

2

Approches théoriques

Sommaire

2.1 Introduction à la théorie

2.2 Méthodes de structure électronique *ab initio*

I.2

Les modèles de chimie quantique appliquée à la détermination de la structure électronique sont utilisés pour décrire les propriétés géométriques et électroniques d'une molécule et, par exemple, pour calculer les énergies et les fréquences vibrationnelles d'une structure donnée. Il y a deux grandes approches fondamentales en chimie numérique : la mécanique moléculaire et la théorie de la structure électronique. La première utilise des formulations empiriques paramétrées de manière *ad hoc*, qu'on appelle généralement des champs de force, pour calculer l'énergie potentielle. La mécanique moléculaire est à même de modéliser des systèmes très grands contenant plusieurs millions d'atomes. Cependant, la principale limitation de cette approche est qu'elle ne prend pas en compte explicitement les électrons. Les méthodes de structure électronique, quant à elles, reposent sur les lois de la mécanique quantique dans le but de prédire les propriétés des systèmes moléculaires. Ces méthodes sont bien plus précises lorsque les propriétés de la molécule étudiée dépendent d'effets électroniques fins [33]. Nous détaillons ci-dessous quelques-uns des modèles de chimie quantique utilisés par les équipes avec lesquelles nous avons collaboré pour les expériences sur les biomolécules. C'est le programme GAUSSIAN [34] qui a servi à explorer les structures géométriques, à calculer les différentes énergies (de stabilisation ou de recombinaison) et à déterminer la forme des orbitales.

2.1 Introduction à la théorie

Les méthodes de structure électronique sont basées sur la résolution de l'équation de Schrödinger. Dans le cas d'une particule, cette équation s'écrit :

$$\left\{ \frac{-h^2}{8\pi^2m} \Delta + V \right\} \Psi(\vec{r}, t) = \frac{ih}{2\pi} \frac{\partial \Psi(\vec{r}, t)}{\partial t}, \quad (2.1)$$

où Ψ est la fonction d'onde, Δ l'opérateur laplacien, m la masse de la particule, h la constante de Planck et V est le potentiel dans lequel la particule évolue. La grandeur $|\Psi|^2$, correspondant au produit de Ψ par son complexe conjugué, est interprétée comme la probabilité de présence de la particule. L'équation de Schrödinger, pour une collection de

particules telle qu'une molécule, est très proche de celle que nous venons d'écrire. Dans ce cas, Ψ est une fonction du temps t et des coordonnées de toutes les particules constituant la molécule. L'énergie ainsi que d'autres propriétés de la molécule peuvent être obtenues en résolvant l'équation de Schrödinger pour Ψ . Si le potentiel V n'est pas fonction du temps, l'équation de Schrödinger peut être simplifiée en utilisant la séparation des variables. On peut ainsi écrire la fonction Ψ comme le produit d'une fonction d'espace et d'une fonction dépendante du temps :

$$\Psi(\vec{r}, t) = \Psi(\vec{r})\tau(t), \quad (2.2)$$

expression que l'on insère dans l'équation 2.1 pour aboutir à deux équations, l'une qui dépend de la position de la particule et qui est indépendante du temps et l'autre qui est seulement fonction du temps. Pour les problèmes qui nous intéressent dans ce manuscrit, on peut ne conserver que l'équation de Schrödinger indépendante du temps :

$$H\Psi(\vec{r}) = E\Psi(\vec{r}), \quad (2.3)$$

où E est l'énergie de la particule et H l'opérateur hamiltonien égal à :

$$H = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2m}\Delta + V. \quad (2.4)$$

Les solutions de l'équation 2.3 correspondent aux différents états stationnaires de la molécule. Celle de plus basse énergie est l'état fondamental. Pour un système moléculaire, Ψ est une fonction des positions des électrons et des noyaux de la molécule. Remarquons que les nucléons ne sont pas traités individuellement, le noyau étant considéré comme une seule entité.

Plusieurs approximations vont être utilisées pour simplifier l'équation de Schrödinger. L'approximation de Born-Oppenheimer est la première d'entre elles. Elle repose sur le fait que la masse du noyau est beaucoup plus grande que celle de l'électron et suppose que le mouvement de ces deux particules est découplé. Cela ne signifie pas que le mouvement nucléaire ne joue pas un rôle important, car il est, en réalité, responsable des vibrations et des rotations de la molécule. L'approximation de Born-Oppenheimer permet d'effectuer le traitement des vibrations et des rotations en supposant, qu'à chaque instant, les électrons sont dans un état stationnaire calculé en admettant que les noyaux restent fixes (approximation adiabatique).

On peut alors écrire, en utilisant les unités atomiques, un hamiltonien électronique qui néglige le terme d'énergie cinétique du noyau :

$$\begin{aligned} H_{\text{elec}} = & -\frac{1}{2} \sum_i^{\text{elec}} \Delta - \sum_i^{\text{elec}} \sum_I^{\text{noyaux}} \frac{Z_I}{|\vec{R}_I - \vec{r}_i|} \\ & + \sum_i^{\text{elec}} \sum_{j < i}^{\text{elec}} \frac{1}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|} + \sum_I^{\text{noyaux}} \sum_{J < I}^{\text{noyaux}} \frac{Z_I Z_J}{|\vec{R}_I - \vec{R}_J|}. \end{aligned} \quad (2.5)$$

Dans cette équation le vecteur position qui décrit l'électron i (j) est noté \vec{r}_i (\vec{r}_j), tandis que celui décrivant le noyau I (J) est noté \vec{R}_I (\vec{r}_J). Le premier terme correspond à l'énergie cinétique de tous les électrons de la molécule, le second à l'attraction entre les électrons et les noyaux, le troisième à la répulsion entre les électrons et le quatrième à la répulsion entre les noyaux. Cet hamiltonien est ensuite utilisé dans l'équation de Schrödinger décrivant le mouvement des électrons dans le champ créé par les noyaux fixes :

$$H_{\text{elec}} \Psi_{\text{elec}}(\vec{r}, \vec{R}) = E_{\text{eff}}(\vec{R}) \Psi_{\text{elec}}(\vec{r}, \vec{R}). \quad (2.6)$$

Les positions nucléaires qui apparaissent dans $\Psi_{\text{elec}}(\vec{r}, \vec{R})$ sont alors des paramètres. La résolution de cette équation pour la fonction d'onde électronique va produire la fonction du potentiel nucléaire effectif $E_{\text{eff}}(\vec{R})$, qui dépend des coordonnées nucléaires et décrit la surface d'énergie potentielle de la molécule. Pour un ensemble de coordonnées \vec{R} , E_{eff} correspond à l'énergie totale calculée pour une structure géométrique donnée, c'est-à-dire déterminée en un point fixe de la surface d'énergie potentielle (*single point energy calculation*). Un tel calcul ne constitue pas une résolution exacte de l'équation de Schrödinger, qui n'est possible que pour quelques systèmes moléculaires extrêmement simples comme H_2^+ . Notons que ce potentiel est également utilisé pour le hamiltonien nucléaire :

$$H_{\text{noyaux}} = T_{\text{noyaux}}(\vec{R}) + E_{\text{eff}}(\vec{R}), \quad (2.7)$$

qui est inséré dans l'équation de Schrödinger décrivant entre autres les états vibrationnels et rotationnels des noyaux. Dans la suite, nous nous concentrons exclusivement sur le problème électronique, les électrons étant responsables des propriétés chimiques des molécules. Comme nous venons de le dire, la complexité de la résolution de l'équation de Schrödinger nécessite de recourir à des hypothèses simplificatrices afin d'obtenir une solution approchée. Les méthodes qui utilisent des approximations mathématiques rigoureuses sont appelées *ab initio* car elles sont basées uniquement sur les lois de la mécanique quantique et un nombre restreint de constantes physiques (vitesse de la lumière, constante de Planck, masses et charges des particules, etc.). Il existe d'autres méthodes de structure électronique comme les méthodes semi-empiriques et les méthodes utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (qui est souvent considérée comme une méthode *ab initio*, ce que nous ferons dans la suite). Les méthodes semi-empiriques utilisent des paramètres issus de données expérimentales pour simplifier le calcul. Elles sont caractérisées par leur jeu de paramètres. L'avantage de ces méthodes est qu'elles sont relativement peu coûteuse en temps de calcul et produisent une description qualitative acceptable des systèmes moléculaires. Lorsque des jeux de paramètres bien adaptés sont disponibles, elles permettent également des prédictions fines des énergies et des structures. Parmi les méthodes semi-empiriques les plus connues, on peut citer les méthodes AM1 (*Austin Model 1*) [35], PM3 (*Parameterized Model number 3*) [36, 37] et MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) [38]. Dans le cadre de cette thèse et avec l'aide des différentes collaborations, des calculs utilisant les méthodes *ab initio* et la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT : *Density Functional*

Theory) ont pu être effectués et comparés aux résultats expérimentaux.

2.2 Méthodes de structure électronique *ab initio*

2.2.1 Différents niveaux de théorie

Les calculs *ab initio* fournissent des prédictions quantitatives de haute qualité pour une large gamme de systèmes et notamment de biomolécules. Le programme GAUSSIAN, dans lequel sont implémentées plusieurs méthodes de calcul *ab initio*, est aujourd'hui largement utilisé en chimie numérique et permet à partir d'un ordinateur standard d'effectuer des calculs sur des systèmes de plusieurs dizaines voire centaines d'atomes. Les modèles proposés par le programme sont caractérisés par leur polyvalence et peuvent être utilisés pour sonder les propriétés de différentes molécules d'intérêt biologique. Ils sont caractérisés par le choix d'un niveau de théorie et d'une base. Il est également possible de préciser comment le spin électronique doit être traité : avec un modèle à couche fermée (électrons appariés) ou modèle à couche ouverte (électrons non appariés).

Théorie Hartree-Fock

L'idée de la théorie Hartree Fock est de dire que le mouvement de chaque électron est décrit par une orbitale moléculaire [39]. Ainsi, la théorie de l'orbitale moléculaire décompose Ψ en une combinaison d'orbitales moléculaires et la façon la plus simple de procéder est d'écrire le produit de Hartree :

$$\Psi(\vec{r}) = \phi_1(\vec{r}_1)\phi_2(\vec{r}_2) \cdots \phi_n(\vec{r}_n), \quad (2.8)$$

où n est le nombre d'électrons du système considéré. Cependant, une telle fonction n'est pas antisymétrique par rapport à l'échange des coordonnées électroniques et n'est donc pas une fonction d'onde adaptée. Par ailleurs, cette approximation ne prend pas en compte le spin. Une première étape consiste donc à inclure le spin électronique sous la forme d'une fonction $\sigma(\omega) = \alpha(\uparrow), \beta(\downarrow)$, où $\alpha(\uparrow)$ et $\beta(\downarrow)$ sont respectivement les fonctions de spin *up* et de spin *down*. Chaque orbitale peut alors être décrite sous la forme du produit :

$$\chi_i(\vec{r}_i) = \phi_i(\vec{r}_i)\sigma_i(\omega). \quad (2.9)$$

Le produit de l'orbitale moléculaire par la fonction de spin est appelé orbitale de spin. On construit alors une fonction d'onde antisymétrique qui est appelée déterminant de Slater :

$$\Psi(\vec{r}) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\vec{r}_1) & \chi_2(\vec{r}_1) & \cdots & \chi_n(\vec{r}_1) \\ \chi_1(\vec{r}_2) & \chi_2(\vec{r}_2) & \cdots & \chi_n(\vec{r}_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(\vec{r}_n) & \chi_2(\vec{r}_n) & \cdots & \chi_n(\vec{r}_n) \end{vmatrix} \quad (2.10)$$

La méthode Hartree-Fock consiste à chercher la meilleure approximation de la fonction

d'onde parmi tous les déterminants de Slater possibles. Ceci revient donc à déterminer le jeu d'orbitales χ_n . Les orbitales moléculaires, qui sont les inconnues du problème, sont exprimées comme une combinaison linéaire de fonctions de base à un électron :

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu i} \varphi_{\mu}. \quad (2.11)$$

Ces fonctions de base peuvent être de n'importe quel type et sont généralement centrées sur les noyaux atomiques. Le logiciel GAUSSIAN utilise des fonctions atomiques de type gaussienne, c'est-à-dire de la forme : $\varphi \propto e^{-\xi r^2}$. Le problème revient à trouver le jeu de coefficients $c_{\mu i}$ qui permet de minimiser l'énergie de la fonction d'onde résultante. La méthode de Hartree-Fock est donc une méthode variationnelle. Comme les équations de Hartree-Fock sont non linéaires, la résolution s'effectue selon une approche numérique itérative. La procédure qui effectue cela est appelée méthode du champ auto-cohérent (SCF : *Self Consistent Field*). Ce nom provient du fait que lorsque la convergence est atteinte, l'énergie est minimale et les orbitales génèrent un champ qui produit les mêmes orbitales. Il convient de garder à l'esprit que la théorie Hartree-Fock n'inclut pas les interactions instantanées entre les électrons, car chaque électron voit les autres électrons comme une distribution moyenne. En particulier, le mouvement des électrons de spin opposé n'est pas corrélé dans cette théorie. Des méthodes plus développées existent et cherchent à remédier à ce problème de la quasi-absence¹ de corrélation électronique dans la théorie Hartree-Fock. Ces méthodes dites *post-SCF*, ou de corrélation électronique, permettent une amélioration significative de la précision des résultats.

Nous évoquons brièvement la théorie de la perturbation de Møller-Plesset et de celle de la fonctionnelle de la densité qui ont été plus particulièrement utilisées pour les calculs présentés dans ce manuscrit.

Théorie de la perturbation de Møller-Plesset

Une première manière de prendre en compte l'énergie de corrélations électroniques est basée la méthode MBPT (*Many-Body Perturbation Theory*), qui est principalement utilisée dans le formalisme de Møller-Plesset. La théorie, présentée pour la première fois en 1934 [40], consiste à prendre en compte les corrélations entre les électrons en les traitant comme une perturbation de la fonction d'onde de Hartree-Fock. Dans ce formalisme, l'hamiltonien total est représenté par la somme de deux termes : l'hamiltonien d'ordre zéro auquel est ajouté un ou plusieurs termes de perturbation. La méthode n'est valable que si la perturbation est petite, de sorte que la fonction d'onde perturbée et l'énergie puissent être développées en série de puissances. Par ailleurs, s'agissant d'une approche perturbative, cette théorie ne suit pas le principe variationnel. Les méthodes basées sur le formalisme de Møller-Plesset sont relativement peu coûteuses en termes de temps de calculs comparativement à d'autres techniques plus évoluées et sont donc très utilisées. En général, les

1. Il ne faudrait pas croire que cette théorie néglige toutes les corrélations entre les électrons. En particulier, elle tient parfaitement compte de celles qui résultent du principe d'exclusion de Pauli.

calculs sont effectués en utilisant la théorie des perturbations au deuxième ordre (MP2). Il est possible de recourir à des ordres plus élevés (MP3, MP4 généralement) mais le temps de calcul devient excessivement long et les résultats pas nécessairement plus précis.

Les techniques post Hartree-Fock plus évoluées sont très efficaces pour retrouver l'énergie des corrélations électroniques, mais la majeure partie d'entre elles sont trop lourdes pour être applicables à des systèmes biomoléculaires complexes dont le nombre d'atomes est important. À la fin des années 60, un modèle alternatif qui a atteint le statut de théorie s'est développé parallèlement à ces techniques. La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) est actuellement l'une des rares méthodes permettant l'étude de systèmes chimiques de grande taille avec un traitement, satisfaisant pour l'étude des biomolécules, des effets des corrélations électroniques.

I.2 Théorie de la fonctionnelle de la densité

L'objectif principal de la théorie de la fonctionnelle de la densité est de remplacer la fonction d'onde électronique par la densité électronique comme quantité de base pour les calculs. L'approche de cette théorie est basée sur la modélisation des corrélations électroniques par des fonctionnelles générales de la densité. La théorie trouve son origine dans le théorème de Hohenberg-Kohn (1964) [41] démontrant l'existence d'une fonctionnelle unique qui détermine exactement la densité et l'énergie de l'état fondamental. Cependant, le théorème ne donne pas la forme de la fonctionnelle. En 1965, Kohn et Sham [42] ont proposé une approche pour trouver des fonctionnelles approchées. La méthode est basée sur le partitionnement de l'énergie électronique en différents termes :

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC}, \quad (2.12)$$

où E^T est l'énergie cinétique due au mouvement des électrons, E^V contient les termes décrivant l'énergie potentielle de l'attraction entre les noyaux et les électrons et la répulsion entre paires de noyaux, E^J le terme de répulsion électron-électron et enfin E^{XC} le terme d'échange et de corrélation qui inclut les autres interactions restantes entre électrons. Ce dernier terme est celui qui contient tout ce qui est inconnu. Remarquons que si nous connaissions la forme exacte de ce terme, le problème pourrait être résolu exactement, car la méthode ne repose, jusqu'à présent, sur aucune approximation. Hohenberg et Kohn ont démontré que E^{XC} est entièrement déterminée par la densité électronique. En pratique, E^{XC} est généralement explicitée sous la forme d'une intégrale qui ne fait intervenir que la densité de spin et éventuellement ses gradients. La fonctionnelle E^{XC} est généralement divisée en deux termes : un terme d'échange E^X et un terme de corrélation E^C . Par ailleurs, il est d'usage que le nom donné aux fonctionnelles correspondent à la première lettre du nom de leur auteur. Si le même auteur a développé plus d'une fonctionnelle, le nom est complété par l'ajout de l'année. Dans le logiciel GAUSSIAN, plusieurs fonctionnelles d'échange sont basées sur la fonctionnelle de Becke (1988), tandis que différentes fonctionnelles de corrélation sont utilisées, par exemple celles de Perdew et Wang (1991) appelées PW91, ou celles

de Lee, Yang et Parr (1988) nommées LYP. Elles permettent déjà d'obtenir des résultats précis. Un degré de précision supplémentaire est atteint en combinant l'échange et la corrélation obtenus par les méthodes DFT avec un certain pourcentage (déterminé de manière empirique) d'échange décrit par la théorie Hartree-Fock. Ces nouvelles fonctionnelles sont appelées fonctionnelles hybrides. Leur utilisation permet une amélioration significative des résultats et est devenue depuis plusieurs années le choix le plus populaire dans le domaine de la chimie quantique et donc de la modélisation de biomolécules. Parmi ces fonctionnelles d'échange-corrélation hybride, la B3LYP, qui correspond à une fonctionnelle de type Becke à trois paramètres, est de loin la plus utilisée pour le type de calculs qui nous intéresse. En conclusion, les méthodes DFT sont particulièrement attractives, parce qu'elles prennent en compte les effets des corrélations électroniques avec un coût en terme de temps de calcul proche de celui des méthodes Hartree-Fock.

2.2.2 Différents types de base

Comme nous l'avons évoqué en présentant l'équation 2.11, les bases sont les représentations mathématiques des orbitales moléculaires. Il s'agit d'un ensemble de fonctions qui sont habituellement des orbitales atomiques, car elles sont centrées sur les atomes. Ces fonctions restreignent chaque électron à une région particulière de l'espace. Ainsi, des bases plus grandes imposent moins de contraintes aux électrons et se rapprochent plus fidèlement des orbitales moléculaires exactes. Les bases standard pour les calculs de chimie quantique utilisent fréquemment des combinaisons linéaires de fonctions gaussiennes pour décrire les orbitales. Le logiciel GAUSSIAN offre un large choix de bases prédéfinies, qui sont classées en fonction du nombre et du type de fonctions de base qu'elles contiennent. Les bases les plus petites sont dites minimales, parce qu'elles ne contiennent que le nombre minimum de fonctions de base nécessaires pour représenter tous les électrons de chaque atome. La base STO-3G est un exemple de base minimale, même s'il ne s'agit pas de la plus petite base possible. Elle utilise trois fonctions primitives gaussiennes (d'où le « 3G ») par fonction de base, afin de décrire les orbitales de Slater (STO signifiant *Slater Type Orbital*).

Plusieurs améliorations peuvent être apportées à ces bases. La première est liée au fait que, dans la plupart des cas, ce sont les électrons de valence qui participent à la création de liaisons chimiques. Ainsi, il est courant de représenter les orbitales de valence par plus qu'une fonction de base, chacune d'entre elles pouvant être à son tour composée d'une combinaison linéaire fixée de fonctions gaussiennes primitives. Un exemple particulièrement connu peut être cité : 6-31G, où le premier chiffre représente le nombre de gaussiennes primitives décrivant les orbitales atomiques de cœur. Les deuxième et troisième chiffres indiquent que les orbitales de valence sont composées chacune de deux fonctions, la première étant composée d'une combinaison linéaire de 3 fonctions gaussiennes primitives, l'autre d'une seule fonction gaussienne primitive. On trouve également des bases dont les orbitales de valence ont recours à trois fonctions : 6-311G.

Les bases à valences séparées permettent aux orbitales de changer de taille mais pas de forme. Pour remédier à cette limitation, des fonctions de polarisation sont ajoutées à la

base. Prenons l'exemple d'une base minimale : il existe une seule fonction de base qui est localisée sur un atome d'hydrogène et qui représente l'orbitale 1s. L'ajout de la polarisation à cette base signifie qu'une fonction de type p est ajoutée à cette base, ce qui permet des représentations plus précises des liaisons entre atomes. De la même façon, il est possible d'ajouter des fonctions d, aux atomes de carbone, ou f, aux métaux de transition. Citons, entre autres, la base 6-31G(d) dont le nom indique que la base 6-31G a été améliorée par l'ajout de fonctions de type d pour les atomes lourds. Un autre exemple est la base 6-31G(d,p) pour laquelle des fonctions p ont été ajoutées aux atomes d'hydrogène. Ces deux bases sont également notées 6-31G* et 6-31G**, respectivement.

Enfin, une autre implémentation commune aux bases est l'ajout de fonctions diffuses, indiqué par un signe +. Ce sont des fonctions de base gaussiennes qui représentent plus précisément les extrémités des orbitales atomiques en leur permettant d'occuper une région plus large de l'espace. Ces fonctions de base supplémentaires sont importantes pour les systèmes dans lesquels les électrons sont relativement loin du noyau, en particulier lorsque l'on considère des anions. On trouve assez fréquemment la notation avec deux + (6-31++G(d) par exemple) indiquant que des fonctions de diffusion ont été ajoutées aux atomes d'hydrogène.

2.2.3 Différents types de calcul

En pratique, définir un modèle de chimie implique de choisir au départ le niveau de théorie et la base. Ce choix est largement conditionné par le type de calcul qui va être effectué. Dans cette thèse, nous utilisons les résultats de calculs fournis par les équipes avec lesquelles nous avons travaillé. Nous nous intéressons plus particulièrement ici à l'optimisation de géométrie et au calcul de l'énergie totale du système.

Optimisation de géométrie

Les calculs d'optimisation de géométrie cherchent les minima locaux de la surface d'énergie potentielle et en déduisent les structures d'équilibre de la molécule. La procédure débute à partir d'une structure qui est spécifiée en entrée et qui évolue sur la surface de potentiel. Elle calcule l'énergie et le gradient en ce point et détermine la direction et la distance du prochain pas. Une optimisation est complète lorsqu'elle a convergé, c'est-à-dire lorsque les forces sont égales à zéro, que l'écart quadratique moyen des forces est proche de zéro, que le déplacement vers le prochain pas et que son écart-type sont inférieurs à une certaine valeur fixée. La présence de ces quatre critères évite toute identification prématurée d'un minimum.

Dans le cas des biomolécules de cette thèse, les structures de départ provenaient de géométries connues issues de bases de données. Lorsque la structure à étudier était plus complexe (cas des agrégats par exemple), une première optimisation était effectuée à partir d'une théorie semi-empirique dont les résultats servaient d'entrée pour les optimisations avec la théorie de la fonctionnelle de la densité.

Calcul d'énergie

Afin de préciser la forme des orbitales moléculaires ou les énergie de stabilisation et de recombinaison, nous avons eu recours à des calculs d'énergie dits *Single Point Energy Calculations*. Il s'agit d'une détermination de l'énergie et des propriétés de la molécule pour une structure donnée (à partir des structures géométriques optimisées). L'énergie calculée est la somme de l'énergie électronique et de l'énergie de répulsion nucléaire de la molécule pour une configuration nucléaire donnée. Le calcul est donc effectué en un point fixe de la surface d'énergie potentielle. Ce type de calcul peut être effectué à n'importe quel niveau de théorie et avec différents types de base. Cependant, pour obtenir une détermination précise de l'énergie de la molécule, des corrections doivent être apportées (énergie de point zéro ou corrections de l'énergie thermique, par exemple).

Terminologie

Afin de désigner les modèles de chimie utilisés, nous utiliserons à plusieurs reprises la convention suivante :

$$\text{méthode_énergie/base_énergie//méthode_géométrie/base_géométrie,}$$

où le modèle indiqué à gauche de la double barre oblique est celui qui a été utilisé pour le calcul de l'énergie et celui à droite, celui grâce auquel la géométrie de la molécule a pu être optimisée. Par exemple, la notation B3LYP/6-311++G(2d,p)//B3LYP/6-31+G(d) signifie que le calcul en énergie est effectué en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (B3LYP) et une base 6-311++G(2d,p), alors que la géométrie a été optimisée avec une base moins développée : 6-31+G(d).



**Expériences réalisées sur les
biomolécules isolées**

3

Fragmentation d'un système complexe d'intérêt biologique en phase gazeuse

Sommaire

- 3.1 Expériences réalisées avec des ions multichargés de basse énergie**
- 3.2 Expériences réalisées avec collisions dans un gaz d'atomes alcalins**

L'objectif de ces expériences est d'étudier les processus de dissociation induits par deux types de perturbation électronique différents sur un système biologique isolé. Il s'agit d'une part, de préciser les voies de fragmentation induites après impact par des ions multichargés de basse énergie, où le phénomène dominant est la capture d'électrons par le projectile et d'autre part, d'étudier la dissociation d'une molécule d'intérêt biologique résultant de la collision avec un atome alcalin, où le phénomène dominant, outre la dissociation de la molécule induite par collision, est la capture d'électrons par la biomolécule. Pour ce faire, il était utile de pouvoir disposer d'une famille de molécules biologiques déjà étudiées par d'autres techniques [43–46] afin de mettre en évidence l'originalité des méthodes d'excitation électronique que nous utilisons.

Notre choix s'est porté sur les porphyrines qui sont des molécules pigmentaires particulièrement importantes [47]. On parle de ligands puisqu'il s'agit de molécules composées d'un groupe d'atomes lié à un atome central métallique. Plus précisément, les porphyrines possèdent une structure géométrique commune qui est constituée d'un noyau tétrapyrrolique et ne diffèrent essentiellement que par la nature de l'atome central et par les éventuelles chaînes latérales attachées au macrocycle. Ainsi, suivant que l'atome central est un atome de fer, de magnésium ou de cobalt, les molécules de porphyrine deviennent le cœur des hèmes¹, de la chlorophylle ou de la vitamine B12 respectivement [48, 49].

Depuis quelques années, la découverte de leurs propriétés de transfert électronique (notamment forte mobilité de charges) a suscité un intérêt grandissant en recherche pour cette famille de molécules [50–52]. En particulier, les porphyrines commencent aujourd'hui à

1. pigment contenant du fer ferreux et qui constitue la partie non protéique de certaines protéines comme l'hémoglobine. Dans cette protéine, son rôle est le transport du dioxygène.

être exploitées dans la réalisation de mémoires électroniques [53–55]. Ce type d'applications laisse suggérer l'importance que pourront jouer, dans l'avenir, ces biomolécules. Il nous a donc paru pertinent d'étudier plus en détail, la façon dont ce type de biomolécules réagit à une excitation intense de son cortège électronique.

3.1 Expériences réalisées avec des ions multichargés de basse énergie

La molécule chloro (meso-tétraphénylporphyrine) fer(III), que nous abrègerons par FeTPPCL, représente un système complexe d'intérêt biologique de choix pour ce type d'expérience. En effet, cette molécule a le mérite d'être stable lors du chauffage qui permet sa mise en phase gazeuse. Par ailleurs, il est possible de comparer nos résultats avec ceux obtenus lors de collisions avec des électrons de 70 eV [56]. La figure 3.1 montre un schéma de la molécule FeTPPCL, mettant en évidence le fait qu'il s'agit d'une molécule comportant un atome de fer comme atome métallique central. On remarque également que, lors de sa synthèse, un atome de chlore reste lié à l'atome de fer, hors du plan du macrocycle.

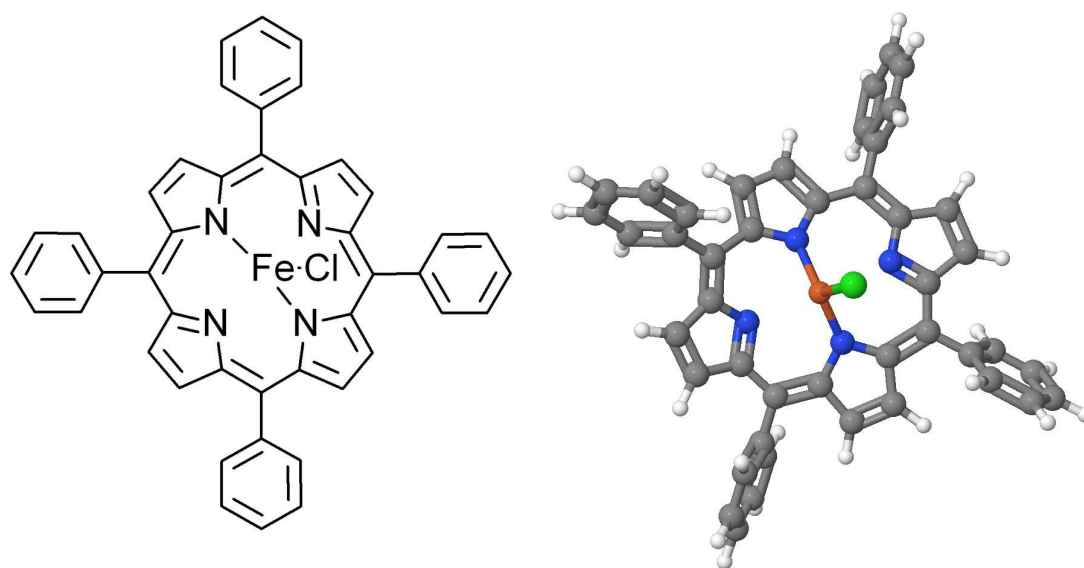


FIGURE 3.1 – Schéma de la structure moléculaire de FeTPPCL ($C_{44}H_{28}ClFeN_4$) en 2D (à gauche) et en 3D (à droite). Les atomes en gris correspondent aux atomes de carbone, ceux en blanc aux hydrogènes, les atomes d'azote sont représentés en bleu, le fer en rouge et l'atome de chlore en vert.

3.1.1 Dispositif expérimental de Caen

Nous décrivons ici le dispositif expérimental utilisé à Caen dans le cadre de ces expériences sur la molécule de FeTPPCL et notamment la source de production de molécules isolées en phase gazeuse. Dans la troisième partie du manuscrit (voir chapitre 5, page 98), nous détaillons les modifications apportées à ce dispositif afin de permettre la production de biomolécules comportant un environnement (agrégats de biomolécules).

Le principe général de cette expérience consiste à faire interagir une vapeur de biomolécules avec différents faisceaux d'ions multichargés (O^{3+} , Ar^{8+}) d'une énergie cinétique de 10 keV par charge. L'évaporation de la biomolécule, initialement sous forme de poudre, est produite grâce à l'utilisation d'un four. Les fragments atomiques ou moléculaires chargés, produits lors de l'impact ionique, sont ensuite analysés par spectrométrie de masse à temps de vol, ce qui permet de déterminer le rapport masse sur charge m/q des fragments issus de la collision et d'obtenir des informations d'ordre structural. Un schéma complet du dispositif expérimental est présenté sur la figure 3.2. Dans la suite, tous les numéros entourés d'un cercle feront référence à cette figure.

Le faisceau d'ions multichargés est produit par une source de type ECR (*Electron Cyclotron Resonance*). Le détail de son fonctionnement et ses principales caractéristiques sont évoqués ci-dessous. Après une première déviation par un dipôle magnétique (nommé dipôle d'analyse car situé en sortie de source), le faisceau passe à travers un déviateur constitué de deux plaques ①. La plaque supérieure est reliée à une alimentation qui délivre + 500 V. La seconde est connectée à un générateur de pulse (HP 8013A) qui travaille en association avec un commutateur haute tension (*push-pull switch* BELKE GHTS 60). La plaque inférieure est portée à un potentiel de + 500 V pendant la durée souhaitée pour former un pulse de faisceau d'ions. Le faisceau est ensuite guidé dans la ligne de transport, où il rencontre à nouveau un dipôle magnétique ②. Avant d'arriver au niveau de la zone d'interaction, le faisceau passe à travers un diaphragme de 3 mm de diamètre ③. Il est focalisé au niveau de la zone de collision par une lentille électrostatique ④. La zone ⑤ où interagissent le faisceau d'ions et les biomolécules neutres, ainsi que le spectromètre pour l'analyse des fragments est décrite à la page 39. L'évaporation des biomolécules a lieu, de façon continue, dans un four en acier inoxydable ⑥. Le four comprend deux parties : un conteneur de 6 cm³ rempli de poudre de biomolécules et un nez formé par un tube de 2 cm de long percé d'un canal de 2 mm de diamètre.

La synchronisation entre la pulsation du faisceau, l'extraction des produits chargés positivement vers le spectromètre et le déclenchement de l'acquisition est mise en évidence sur le chronogramme de la figure 3.3.

Source ECR et ligne de transport

Nous avons réalisé les expériences sur l'installation ARIBE², qui dispose d'une source d'ions multichargés très stable dans le temps et à même de fournir des intensités de faisceaux importantes comparativement aux sources ECR de sa catégorie. Nous détaillons ci-dessous le principe générale des sources ECR, puis nous précisons les caractéristiques et spécificités de la plateforme caennaise [57].

Lorsque des électrons de charge e et de masse m se déplacent dans un champ magnétique \vec{B} , ils tournent autour des lignes de champ magnétique, à cause de la force de Lorentz. Leur fréquence de rotation est appelée fréquence cyclotron (ω_{cyc}). Si on soumet les électrons à une onde électromagnétique de fréquence (ω_{hf}) égale à la fréquence cyclotron, ils peuvent

2. ARIBE : Accélérateurs pour la Recherche Interdisciplinaire avec les ions de Basse Énergie

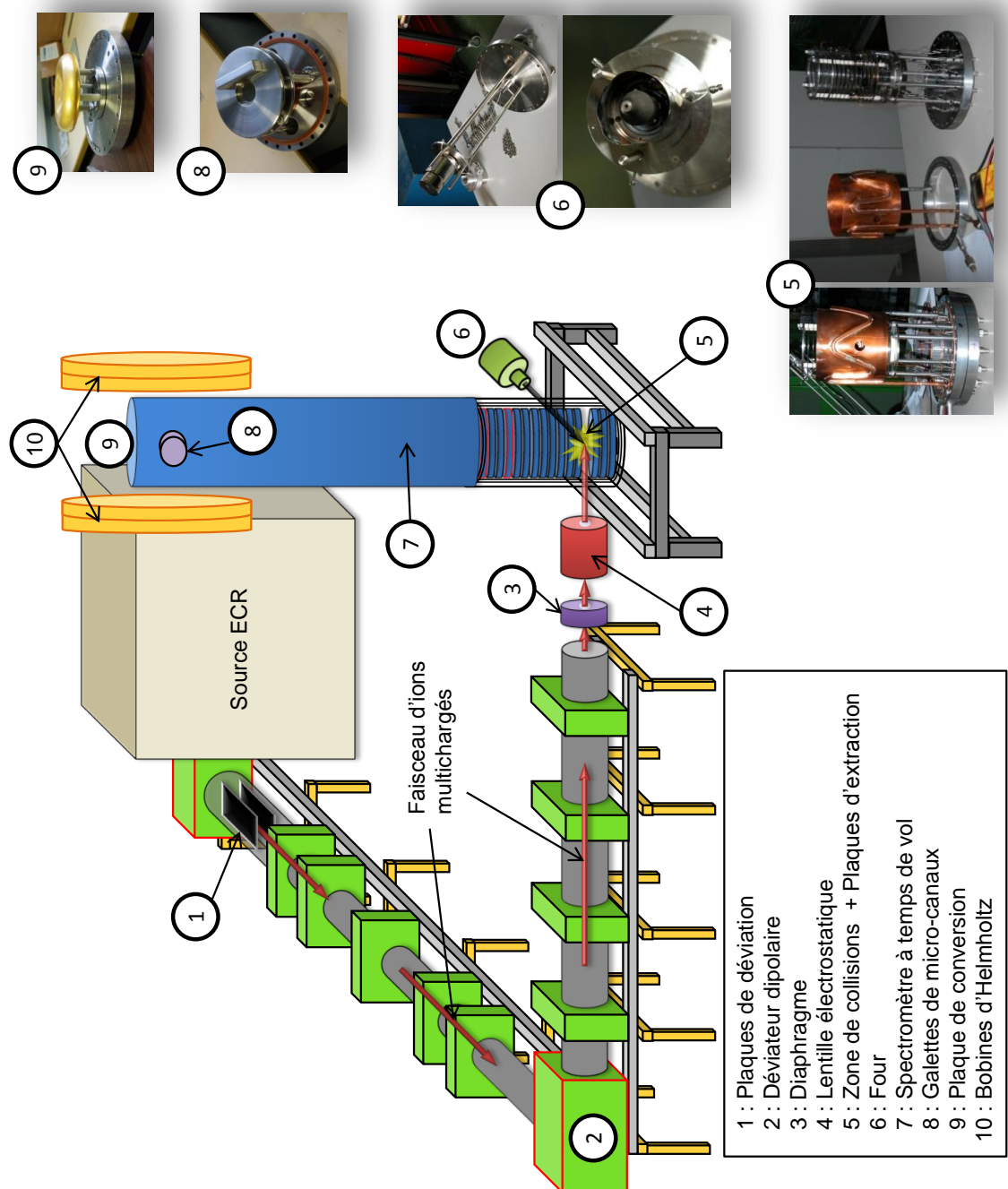


FIGURE 3.2 – Schéma général du dispositif expérimental de Caen. Les différents éléments numérotés sont détaillés dans le texte. Brièvement, les ions multichargés sont produits par la source ECR, guidés jusqu'au dispositif expérimental par une ligne de transport magnétique (dipôle magnétique en ②). Le four ⑥ permet l'évaporation des biomolécules au niveau de la zone d'interaction ⑤. Les fragments produits sont analysés grâce à un spectromètre de masse à temps de vol ⑦.

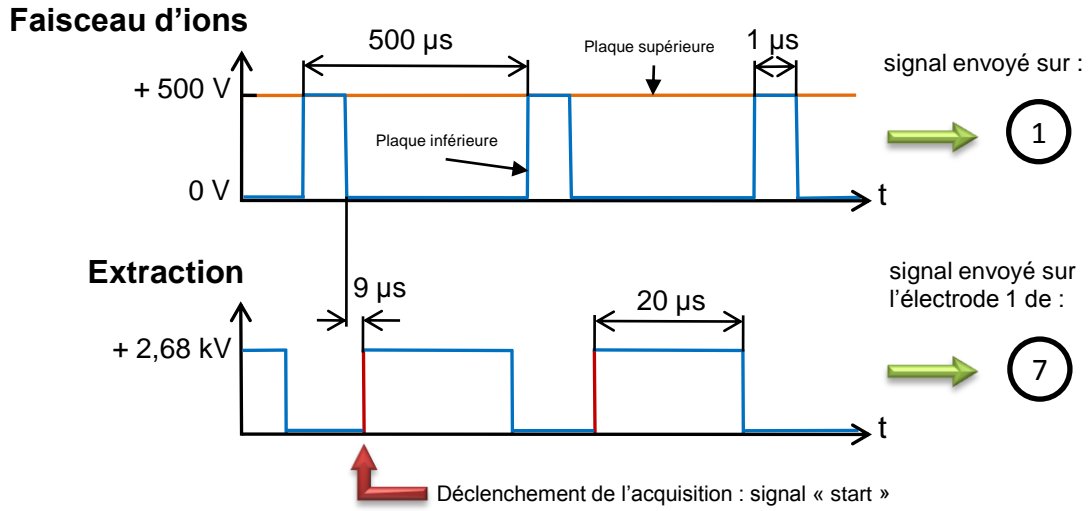


FIGURE 3.3 – Chronogramme de l'expérience de Caen. Les numéros font référence à la figure 3.2. La représentation schématique des signaux n'est pas à l'échelle.

être accélérés, ce qui se traduit par un accroissement de leur rayon de giration. La condition de résonance cyclotronique électronique se traduit mathématiquement par :

$$\omega_{hf} = \omega_{cyc} = \frac{e \times B}{m} \quad (3.1)$$

Dans les sources ECR, le gaz des atomes à ioniser est injecté dans une enceinte sous vide secondaire (de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} mbar) et un plasma, où cohabitent ions et électrons, est amorcé jouant le rôle de « réservoir d'ions ». Les électrons du plasma sont confinés grâce à la superposition d'un champ magnétique axial (produit par des solénoïdes ou des aimants permanents) et d'un champ magnétique radial généré par un hexapole. Il en résulte que l'intensité du champ magnétique possède un minimum au milieu de la structure et qu'il augmente, à partir de là, dans toutes les directions. Ainsi, une surface fermée est produite (bouteille magnétique), à l'intérieur de laquelle la condition de résonance cyclotronique électronique est réalisée. Pour former dans ce plasma des ions multichargés, il suffit de bombarder les atomes avec des électrons suffisamment énergétiques, c'est-à-dire suffisamment accélérés, chaque collision arrachant un électron périphérique de l'atome. Ainsi, des ions hautement chargés peuvent être produits suite à de nombreuses ionisations simples successives. Ces ions ne sont pas accélérés parce que leur masse est bien plus importante que celle des électrons. En utilisant une géométrie d'extraction appropriée et grâce à l'application d'une haute tension, les ions peuvent être extraits de la source. La qualité du faisceau est déterminée en particulier par la géométrie et la tension d'extraction mais aussi par l'intensité du champ magnétique.

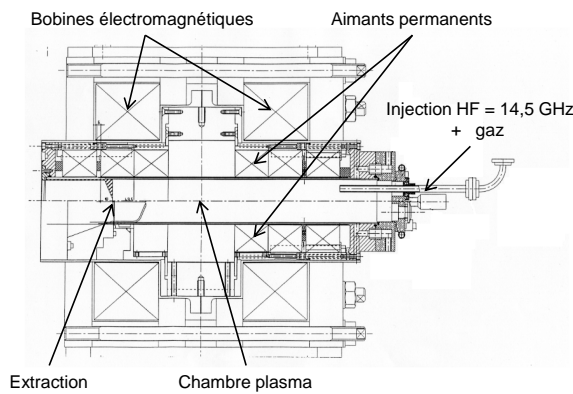
La source SUPERSHYPIE de l'installation ARIBE est utilisée à une fréquence de 14,5 GHz. Son originalité réside dans la conception particulière de son champ magnétique axial. L'action conjointe de bobines électromagnétiques et d'aimants permanents permet d'améliorer notablement les caractéristiques du faisceau d'ions. D'autre part, l'adjonction

Ion	Intensité (en $e\mu A$)	Ion	Intensité (en $e\mu A$)
He ⁺	1500	Ar ⁸⁺	250
He ²⁺	1500	Ar ¹⁶⁺	1,9
O ⁶⁺	450	Xe ²³⁺	11

TABLE 3.1 – Intensités typiques de quelques faisceaux d'ions multichargés produits par la source SUPERSHYPIE. Les mesures sont effectuées après le dipôle d'analyse.

de deux anneaux magnétiques permanents en extension de l'hexapole a permis d'augmenter sensiblement les performances de la source (voir figure 3.4). Les intensités typiques de faisceaux d'ions délivrées par la source sont indiquées dans le tableau 3.1. Les mesures sont prises à l'aide d'une cage de Faraday placée dans le plan focal du dipôle d'analyse pour une énergie cinétique de 17 keV par charge (q^3).

Dessin technique de la source ECR



Champ magnétique axial de la source

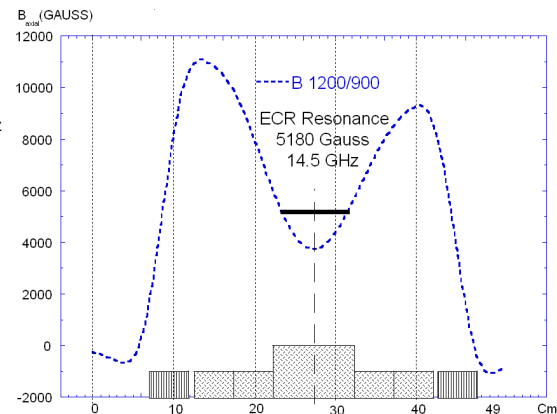


FIGURE 3.4 – Dessin technique de la source SUPERSHYPIE (à gauche). À droite, représentation du champ magnétique axial résultant de l'action conjointe des solénoïdes et des aimants permanents

La source ECR est placée sur une plateforme haute tension permettant de produire des faisceaux dans une gamme d'énergie comprise entre 1,5 et 25 keV par charge. La ligne de faisceau est optimisée pour le transport d'intensités élevées avec une très grande émittance qui est supérieure à $150 \pi \cdot \text{mm} \cdot \text{mrad}$. Le vide à l'intérieur de la ligne est de l'ordre de 10^{-9} mbar, ce qui limite grandement l'échange de charge avec le gaz résiduel. Le pompage est opéré par deux pompes turbomoléculaires et deux pompes cryogéniques. La rigidité magnétique maximum⁴ est de 0,136 T.m et est limitée par le dipôle d'analyse. La ligne possède une très bonne transmission égale à 80%. Afin de caractériser le transport des ions multichargés, la ligne est équipée de boîtes de diagnostic associées à des imageurs à fils et de cages de Faraday. Le faisceau peut-être coupé par des jeux de fentes situés dans le plan focal du dipôle d'analyse. Enfin, le contrôle complet de la ligne et des différents paramètres (optimisation du courant dans les dipôles et les quadripôles, contrôle de la géométrie du

3. Remarquons que dans tout le manuscrit q est un nombre sans dimension, de sorte que m/q est en unité de masse atomique. La convention d'écriture choisie est donc $z = qe$, où q n'a pas d'unité.

4. Elle correspond au rayon de giration maximum d'une particule placée dans un champ de 1 Tesla

faisceau, vide, etc.) est supervisé par un programme de commande LABVIEW⁵.

Les bonnes performances de cette ligne, associées à la très grande stabilité de la source d'ions multichargés, permettent de réaliser des expériences de longue durée. C'est en particulier le cas des expériences présentées ici pour lesquelles l'obtention d'un spectre de masse, avec une statistique exploitable, représente en moyenne 7 heures d'acquisition.

Spectromètre à temps de vol

Le spectromètre que nous utilisons à Caen est basé sur le principe de Wiley-MacLaren [58]. Il est constitué de trois parties différentes : une zone d'ionisation-accélération, une zone de vol libre et une zone de détection. La figure 3.5 est une vue schématique du spectromètre et montre explicitement ces trois zones.

Zone d'ionisation-accélération La première zone du dispositif correspond à la zone de collision et à l'extraction des fragments chargés produits. Cette zone est constituée des régions 1 et 2 du schéma 3.5. La région 1 est composée d'un ensemble de 12 anneaux en acier inoxydable séparés les uns des autres par des isolants en céramique. Le premier anneau est en réalité un disque qui mesure 130 mm de diamètre, il est suivi de 11 anneaux de 130 mm de diamètre extérieur et de 90 mm de diamètre intérieur. Le douzième anneau est recouvert d'une grille en nickel de transmission 90% et termine la région 1. À noter que les anneaux 3 et 4 ont un profil particulier (découpe rectangulaire) qui permet de laisser passer à la fois la vapeur de biomolécules et le faisceau d'ions. Le champ électrique \vec{E}_1 présent dans la région 1 correspond au champ d'extraction des fragments positifs. Il correspond à la différence de potentiel créée entre la première électrode (portée à +2,68 kV) et la grille du 12^{me} anneau relié à la masse. Pour garantir l'homogénéité du champ électrique dans cette région, les différents anneaux sont connectés entre eux par des résistances de 2,2 k Ω . Comme l'extraction est pulsée, l'alimentation haute tension qui délivre le potentiel du disque 1 (FUG HCN140-6500) est également pulsée. On utilise pour cela un *push-pull switch* (BELKE GHTS 100) qui permet de commuter rapidement des signaux haute tension. La région 2 correspond à la zone d'accélération conformément au design de Wiley et McLaren. Le champ électrique \vec{E}_2 est produit entre la grille reliée à la masse et celle qui termine la région 2. Cette dernière est portée à un potentiel constant de -5 kV (FUG HCN140-6500). Deux anneaux répartis entre les grilles assurent un champ d'accélération constant. Des résistances de 4 M Ω relient l'ensemble de ces quatre éléments. Enfin une paroi en cuivre intégrant un circuit de refroidissement à l'azote liquide ⑤ permet de piéger le gaz résiduel et ainsi de limiter l'influence des polluants sur le spectre de masse.

Zone de vol libre Les fragments positivement chargés vont pouvoir évoluer librement dans la région 3, qui est longue d'un mètre. Deux plaques métalliques en acier inoxydable sont disposées sur les côtés du spectromètre. Elles mesurent 980 × 100 mm et sont séparées l'une de l'autre de 100 mm. Elles permettent de créer un champ électrique \vec{E}_3 qui est

5. <http://www.ni.com/labview/f/>

perpendiculaire à l'axe du spectromètre. Ce champ permet de compenser la dérive des fragments chargés qui est due à la vitesse initiale perpendiculaire à l'axe du spectromètre des biomolécules. Afin de garantir l'homogénéité du champ, neuf lames de 970 mm de long sont disposées entre ces deux plaques. Des résistances de 330 k Ω assurent la connection électrique entre ces électrodes. Comme le montre le schéma de la figure 3.5, l'une des plaques (en vert) est au potentiel $-V$ qui correspond à celui de la dernière grille de la région 2 (-5 kV). Une ouverture de 90 \times 90 mm a été pratiquée à une extrémité de la plaque de façon à y coller une grille de transmission 90%. La grille se trouve donc au potentiel $-V$. L'autre plaque est au potentiel $-V + \Delta V$. Généralement un ΔV de quelques dizaines de volts suffit à compenser la dérive des ions et les diriger sur le détecteur.

Zone de détection De façon à rendre l'efficacité de détection indépendante du rapport m/q des fragments, les galettes de micro-canaux ne sont pas disposées directement en face des espèces chargées extraites de la zone de collision. Le système de détection du spectromètre repose sur l'utilisation d'un détecteur de Daly modifié [59]. Une plaque en acier inoxydable recouverte d'une fine couche d'or ⑨ est portée à un potentiel de -25 kV (alimentation FUG HCN 35-35000). Les fragments chargés positivement vont venir heurter la plaque dite de conversion. À chaque impact, des électrons secondaires vont être émis depuis la surface d'or. La trajectoire des électrons rétrodiffusés est ensuite déviée par un champ magnétique constant \vec{B} , créé par des bobines de Helmholtz situées à l'extérieure de l'enceinte ⑩. Les électrons sont accélérés vers la grille placée devant les galettes de micro-canaux ⑧ puisque celle-ci est portée à un potentiel de -5 kV. Les deux galettes de 40 mm de diamètre sont montées en chevron et portées respectivement à -18 kV et -16 kV. Enfin, une anode collectrice de forme conique en cuivre permet de récupérer la gerbe d'électrons provenant des galettes. S'agissant d'un spectromètre à temps de vol, c'est donc l'information du temps d'arrivée des fragments qui importe. Après passage dans une chaîne électronique standard (préamplificateur et amplificateur), les signaux temporels sont convertis en impulsions normalisées de type NIM (amplitude -0,7 V et largeur à mi-hauteur de l'ordre de la dizaine de ns). Ces impulsions sont envoyées vers un ordinateur équipé d'une carte analyseur de temps de vol (FAST ComTec P7888), qui stocke le temps d'arrivée de l'impulsion à partir du signal de départ (voir la figure 3.3 et le signal « *start* »). Ainsi, les ions qui atteignent le détecteur pendant la durée de l'acquisition constituent les « *stops* ». Ce temps d'arrivée d'un fragment est converti en canal par la carte. L'ordinateur stocke ensuite dans un même fichier le nombre de « *stops* » arrivant par canal. Ceci permet d'obtenir un spectre de temps de vol qui associe à chaque canal, un nombre de coups. De façon à calibrer le spectre en rapport m/q , on utilise la relation :

$$\text{Canal} = a\sqrt{\frac{m}{q}} + b \quad (3.2)$$

, où a et b sont des constantes déterminées à partir de pics de référence.

En définitive, le spectromètre possède une résolution $m/\delta m$ égale à 1500 pour $m = 720$ unités de masse atomique. Néanmoins, il arrive que la résolution observée sur les spectres

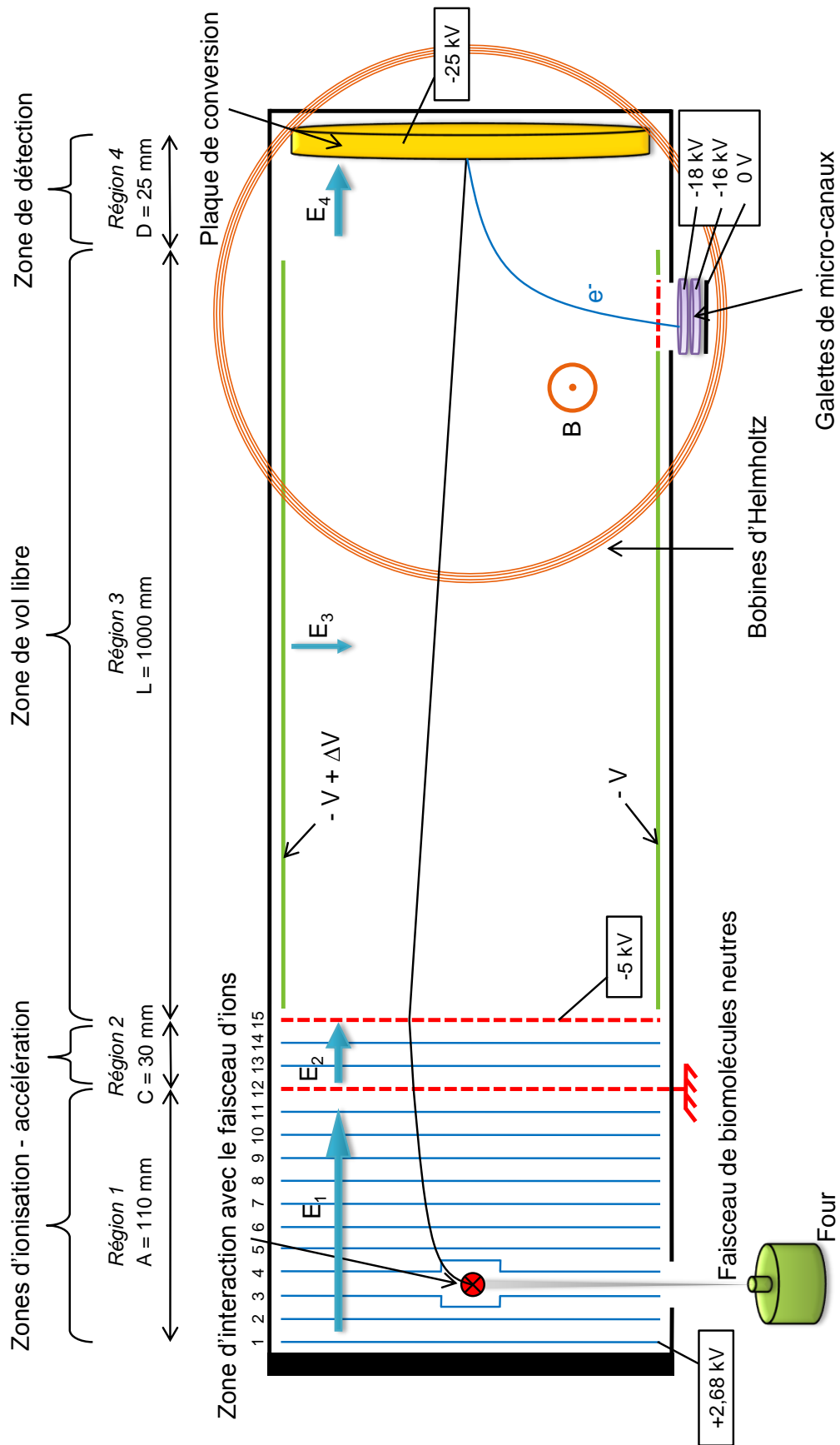


FIGURE 3.5 – Schéma du spectromètre de masse à temps de vol du dispositif expérimental de Caen. Le spectromètre se divise en trois zones différentes.

soit en deçà de cette valeur. On observe parfois des pics très asymétriques présentant un épaulement du côté des masses plus importantes. Ce phénomène peut être expliqué par un processus de fragmentation ou d'émission retardée, qui a lieu dans la zone d'ionisation-accélération. Nous allons prendre un exemple pour illustrer les réactions qui peuvent se produire. Prenons une molécule M^+ qui a été ionisée par un ion multichargé et supposons qu'elle perde un fragment neutre B suite à cette excitation électronique. On a alors la réaction :



En se référant à la figure 3.5, trois cas de figure peuvent se présenter :

- la perte du fragment neutre intervient immédiatement après l'ionisation et avant le pulse d'extraction. Dans ce cas on va détecter le fragment A^+ à la position m_A/q (où $q = 1$) ;
- l'émission de l'espèce B a lieu dans la zone de vol libre. Les ions n'étant soumis à aucun champ d'accélération, le fragment A^+ possède alors la même vitesse que l'espèce M^+ dont il est issu. Le cation A^+ sera donc également détecté à la position m_M/q (où $q = 1$). Le physicien ne peut donc pas savoir *a priori* qu'il y a eu perte d'un neutre ;
- la réaction 3.3 a lieu dans la zone d'ionisation-accélération, mais pendant l'extraction. Dans cette zone, les ions sont soumis soit au champ \vec{E}_1 , soit au champ \vec{E}_2 . Avant que la fragmentation n'ait lieu, l'espèce M^+ est accéléré par l'un de ces deux champs suivant sa position. Lorsque l'émission retardée du fragment A^+ intervient, le cation est accéléré à son tour, mais pendant un temps inférieur à une espèce qui aurait été formée avant l'extraction. On va alors détecter un ion à une position m/q comprise entre m_A/q et m_M/q (avec $q = 1$). L'ion apparaîtra dans le spectre entre la position de A^+ et celle de M^+ . C'est la raison de l'épaulement des pics présentés dans la partie 3.1.2.

3.1.2 Résultats et discussions

Dans cette expérience, deux types de projectiles différents ont été utilisés : O^{3+} et Ar^{8+} à une énergie cinétique par charge de 10 keV/ q . L'influence de la charge de l'ion sur les voies de fragmentation de la molécule de porphyrine a ainsi pu être étudiée.

La figure 3.6 présente un spectre de fragmentation obtenue après collision entre des ions O^{3+} à 30 keV et la molécule de FeTPPCL. Le premier constat que l'on peut faire, c'est que la molécule intacte simplement chargée $FeTPPCL^+$ (de rapport m/q égal à 703 unités de masse atomique) constitue le pic principal de ce spectre. La molécule non fragmentée est également observée jusqu'à une charge q égale à 3. Du fait de sa position en dehors du plan de la molécule, l'atome de chlore est particulièrement exposé lors de la collision avec les ions multichargés. Ainsi la perte de chlore, qui intervient dès la formation de $FeTPP^+$, devient de plus en plus importante avec l'augmentation de l'état de charge du

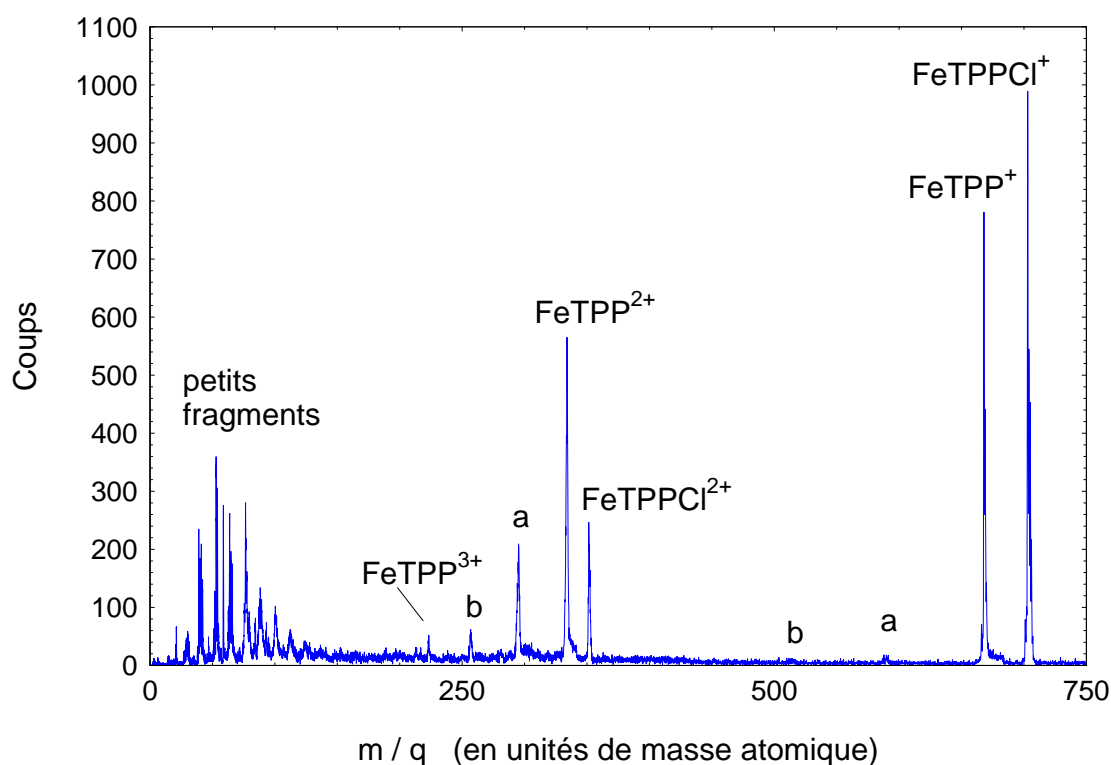


FIGURE 3.6 – Spectre de fragmentation de FeTPPCl obtenu après collision avec des ions O^{3+} à 30 keV. Les indications *a* et *b* correspondent aux pics de la molécule ayant perdu l'atome de chlore et, respectivement, un ou deux groupements phenyl.

système. De façon plus précise, la proportion entre la molécule intacte (FeTPPCl) et celle ayant perdu cet atome (FeTPP) s'inverse même dès la formation de l'espèce doublement chargée. Il est intéressant de rappeler que cet atome de chlore, attaché à l'atome de fer central de la porphyrine, n'a initialement pas de raison d'être sur cette molécule dans la mesure où il est issu du processus de synthèse chimique. Aussi, nous allons voir que ce qui apparaît *a priori* comme un élément gênant peut en réalité jouer un rôle de sonde pour les différents processus de fragmentation intervenant au niveau de la molécule. Le spectre de masse de la figure 3.6 montre également qu'un ou deux groupements phenyl (symbolisés par le lettre R sur la figure 3.1) sont perdus, en plus du chlore, lors de l'impact avec l'ion O^{3+} . Les fragments ainsi formés sont nommés *a* et *b* sur la figure 3.6. De la même façon que pour le chlore, ces voies de fragmentation deviennent d'autant plus importantes que l'état de charge du système augmente. Enfin, le spectre est caractérisé par de nombreux petits fragments localisés dans des rapports m/q inférieurs à 100 unités de masse atomique (u.m.a. dans la suite) qui proviennent de la dissociation de la molécule multi-ionisée.

Nous montrons maintenant comment l'analyse des contributions isotopiques des différents fragments obtenus permet de tirer des informations sur la perte d'atomes d'hydrogène. Nous étudions également les processus de fragmentation retardés intervenant sur des échelles de temps de l'ordre de quelques microsecondes. Enfin, nous précisons les fragments atomiques et les espèces chargées du type C_nH_m formés lors de la collision.

Analyse des contributions isotopiques

Le spectre de fragmentation de la figure 3.6 possède une résolution suffisante pour permettre une analyse précise des contributions isotopiques des différents fragments formés lors de l'interaction avec les ions multichargés. De fait, une calibration précise du rapport m/q a été effectuée.

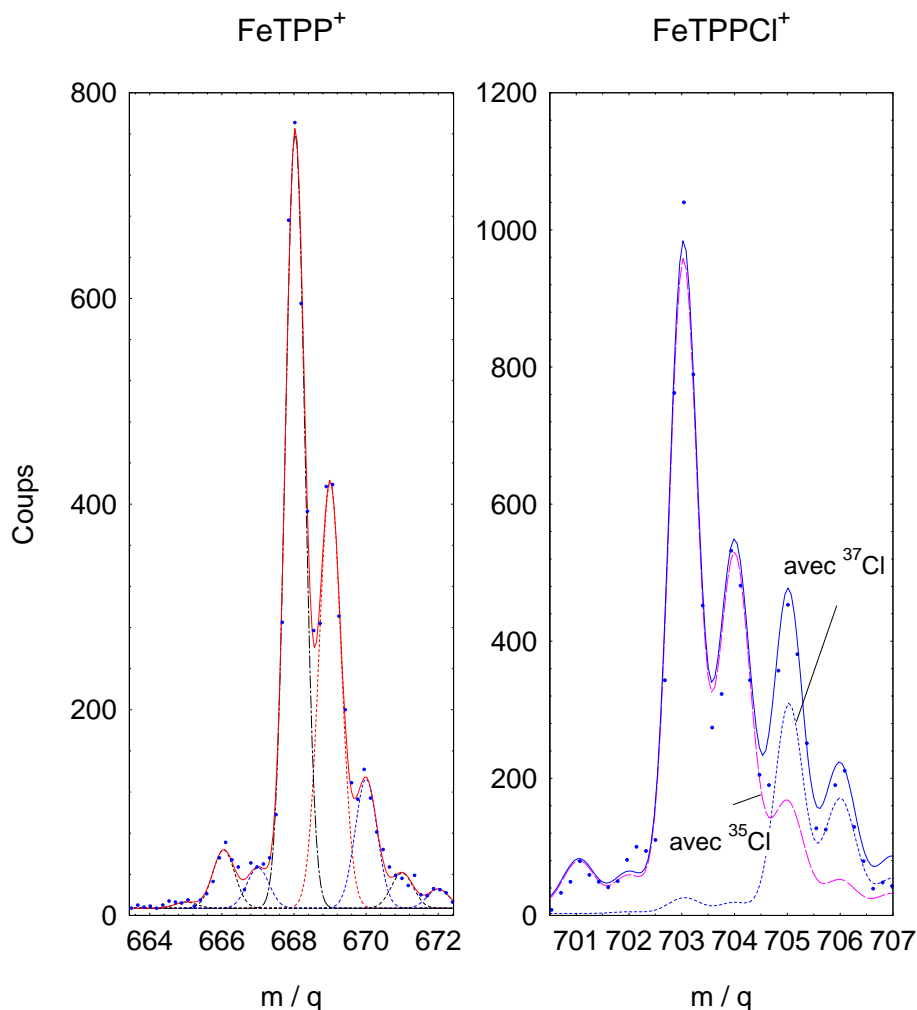


FIGURE 3.7 — Distribution isotopique des ions FeTPP^+ et FeTPPCl^+ .

La figure 3.7 est une vue plus détaillée des deux espèces simplement chargées majoritaires (FeTPPCl^+ et FeTPP^+) présentes sur le spectre précédent. Elle montre, d'une part, la distribution des isotopes obtenus expérimentalement (traits continus) et, d'autre part, l'ajustement obtenu à l'aide de fonctions gaussiennes (traits discontinus). Les pics visibles sur le spectre de gauche aux masses 666 et 667 u.m.a. s'expliquent par la présence de l'atome de fer central sous la forme de l'isotope ^{54}Fe , alors que les autres pics ne font intervenir que l'espèce ^{56}Fe . Sur le spectre de droite, nous avons procédé de façon légèrement différente. En effet, nous avons repris la courbe globale en pointillés obtenue pour le fragment FeTPP^+ (spectre de gauche) à laquelle nous avons ajouté la contribution des atomes de ^{35}Cl et de ^{37}Cl en respectant leur abondance isotopique relative à l'état naturel.

FeTPP ⁺		FeTPPCl ⁺	
Masse (u.m.a.)	Abondance relative (%)	Masse (u.m.a.)	Abondance relative (%)
666	3.56	701	2.60
667	1.76	702	1.28
668	56.51	703	42.15
669	29.11	704	21.69
670	7.56	705	19.65
671	1.31	706	8.23
672	0.17	707	2.01
673	0.02	708	0.34
-	-	709	0.04
FeTPP ²⁺		FeTPPCl ²⁺	
Masse (u.m.a.)	Abondance relative (%)	Masse (u.m.a.)	Abondance relative (%)
333	3.56	350.5	2.60
333.5	1.76	351	1.28
334	56.51	351.5	42.15
334.5	29.11	352	21.69
335	7.56	352.5	19.65
335.5	1.31	353	8.23
336	0.17	353.5	2.01
336.5	0.02	354	0.34
-	-	354.5	0.04

TABLE 3.2 – Abondance relative des différents isotopes des molécules de FeTPP et FeTPPCl simplement et doublement chargées. Les valeurs théoriques sont calculées à partir des données du NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>) et du calculateur de l'Université de Manchester (<http://fluorine.ch.man.ac.uk/research/mstool.php>).

On peut constater que l'accord entre la courbe mesurée et celle obtenue par cette méthode après normalisation à la même intensité totale est particulièrement bonne.

Par suite, il est possible de comparer plus précisément les contributions isotopiques attendues à celle obtenues pendant cette expérience pour en tirer des informations plus fines sur la formation d'espèces ionisées ou fragmentées, simplement et doublement chargées. Dans un premier temps, nous avons effectué un ajustement gaussien précis sur chacun des pics présents sur le spectre de masse pour les espèces suivantes : FeTPPCl⁺, FeTPP⁺, FeTPPCl²⁺ et FeTPP²⁺. L'intégrale de chaque fonction gaussienne a alors été calculée puis normalisée à l'intensité totale des pics de l'espèce considérée. Il est alors possible de représenter ces résultats expérimentaux sous la forme d'histogrammes et de comparer la distribution obtenue avec celle fournie par le calcul théorique de l'abondance relative des différents isotopes à partir de la formule chimique de la molécule de porphyrine (voir tableau 3.2). Le résultat de ce travail est présenté sur la figure 3.8.

La partie supérieure de cette figure concerne les espèces simplement chargées alors que la partie inférieure se focalise sur les espèces doublement chargées. Pour les molécules FeTPPCl⁺ et FeTPP⁺, il est possible d'approfondir les constatations issues de l'étude de la figure 3.7. On peut alors remarquer que l'intensité du pic principal issu de l'expérience est légèrement sous-représentée au profit des isotopes de masses 666 et 667 u.m.a. (dans

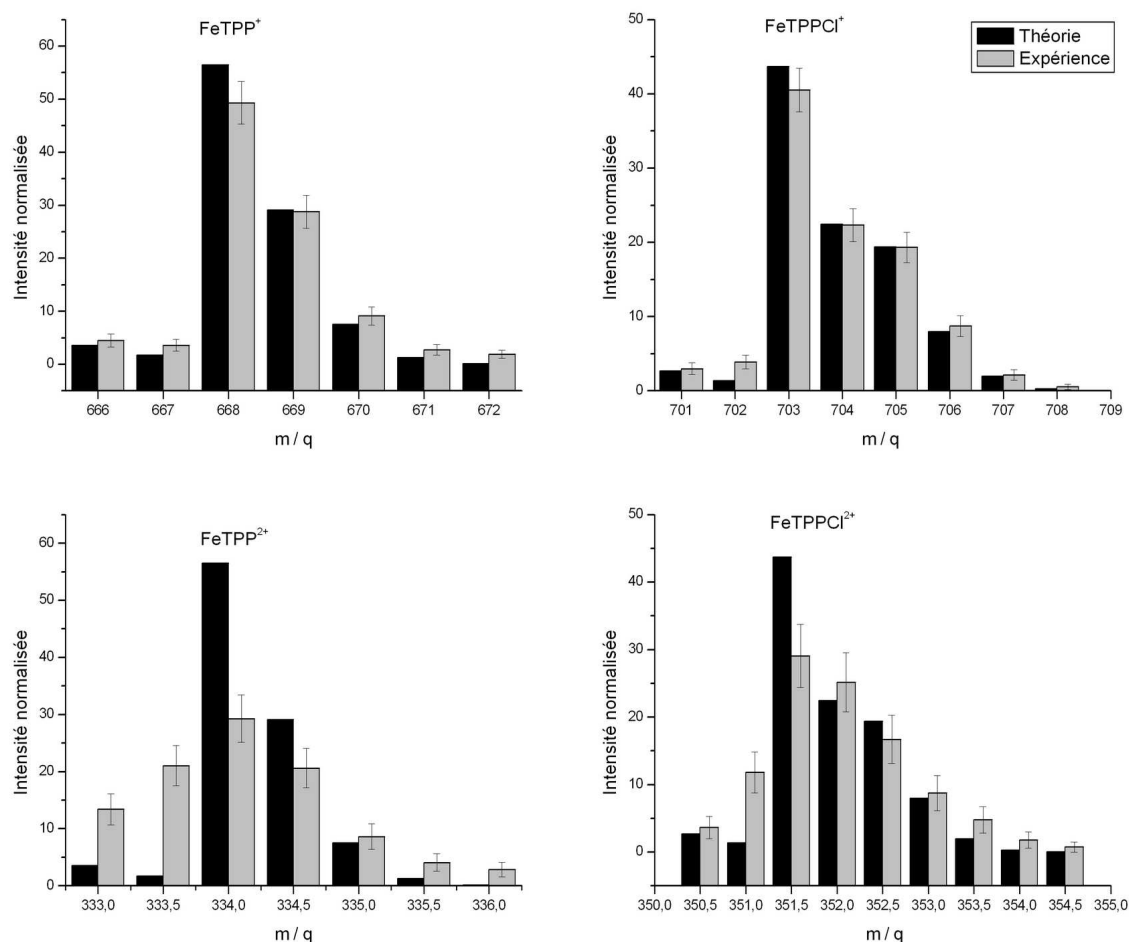


FIGURE 3.8 — Distribution isotopique pour les ions de porphyrine simplement (en haut) et doublement (en bas) chargés. Les données sont tirées du spectre de collisions avec O^{3+} à 30 keV.

le cas de $FeTPP^+$) et 701, 702 u.m.a. (dans le cas de $FeTPPCl^+$). Cette observation s'explique par le fait qu'un ou deux atomes d'hydrogène peuvent être émis, avec une probabilité relativement faible, lors de la formation de ces espèces simplement ionisées. Cette explication, rapportée au cas des espèces doublement chargées, montre que la perte d'hydrogène est beaucoup plus importante dans le cas de la formation des molécules $FeTPPCl^{2+}$ et $FeTPP^{2+}$.

Ce type d'expérience a également été réalisé avec un faisceau d' Ar^{8+} et nous avons remarqué que jusqu'à 6 atomes d'hydrogène pouvaient être perdus dans un processus de capture électronique ne faisant intervenir qu'un seul électron. La figure 3.9 illustre ce phénomène.

Une comparaison plus systématique des différents résultats issus, d'une part, des expériences de collisions avec des ions multichargés et d'autre part, de ceux provenant des études avec des électrons [56] est visible sur le tableau 3.3. Nous y avons reporté les intensités relatives des principales espèces ioniques créées lors des collisions avec la molécule de porphyrine neutre. Nous avons attribué la valeur 10000 à l'intensité du pic le plus intense de chaque spectre. Notons que cette normalisation ne permet pas de comparer directement

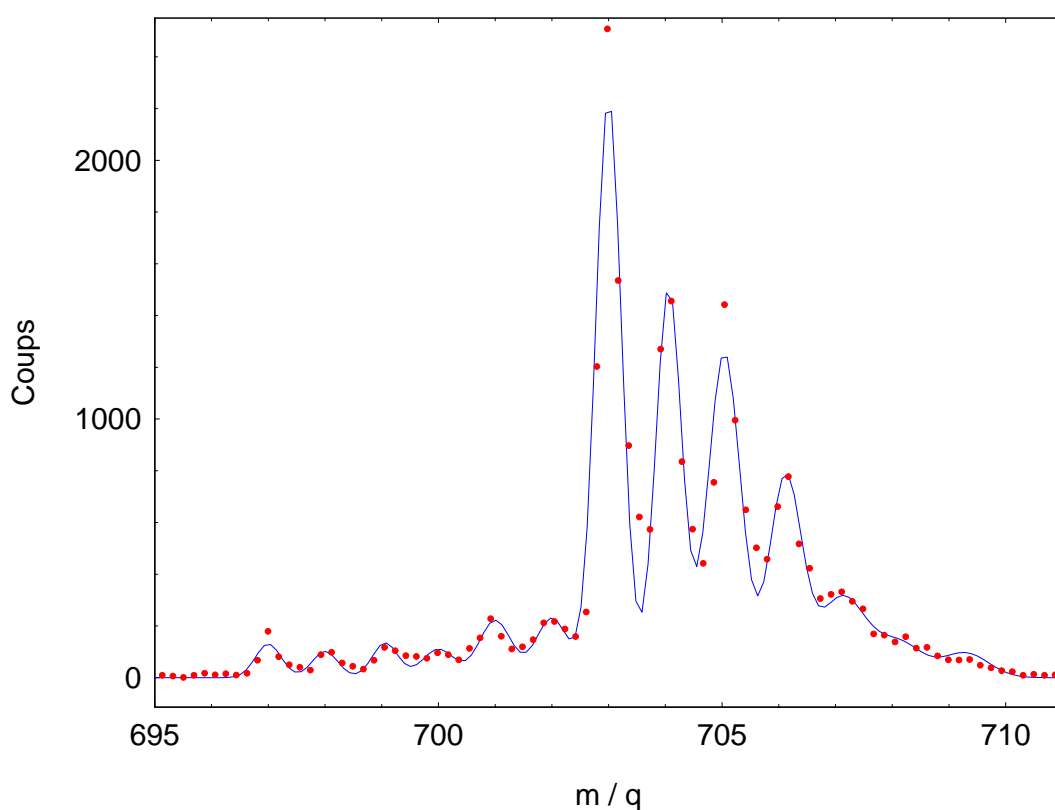


FIGURE 3.9 — Vue agrandie du spectre de masse correspondant aux ions simplement ionisés FeTPPCl^+ produits lors de la collision avec des ions Ar^{8+} à 80 keV. On observe clairement la perte d'atomes d'hydrogènes (jusqu'à 6) à gauche du pic de FeTPPCl^+ à $m/q = 703$. La courbe bleue est un ajustement des données expérimentales présentées en pointillés rouges.

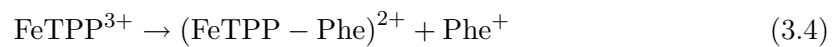
les intensités des différents spectres entre eux, mais donne seulement une indication des rapports de branchement sur un même spectre. En ce qui concerne les données des collisions avec les électrons, les nombres indiqués ne sont que des estimations provenant de la référence [56] et ne sont donc utilisés qu'à des fins de comparaisons qualitatives.

La proportion de molécules de porphyrine intactes après ionisation par des électrons est extrêmement faible en comparaison avec ce qui est produit avec les ions multichargés, comme le montre la figure 3.10. La perte de chlore est donc quasiment systématique dans le cas de l'ionisation par des électrons. Cela démontre aussi à quel point l'ionisation par les ions multichargés de basse énergie (O^{3+} et Ar^{8+} à 10 keV/ q) est un processus « doux » dans lequel très peu d'énergie est transféré à la molécule [60,61]. Toujours dans le cas des ions, le tableau montre que lorsque la charge du projectile augmente, la perte de cet atome de chlore devient de moins en moins importante. En effet, lorsque la charge augmente, la simple et la double ionisation de la cible peuvent provenir de collisions plus périphériques, lors desquelles l'énergie transférée est plus faible. Ceci est à la fois vérifié dans le cas de la simple et de la double capture électronique. Remarquons au passage que la présence de cet atome de chlore peut bel et bien être utilisée comme une sonde de l'énergie transférée. On note, de façon surprenante, que la perte de groupements phényle augmente avec l'état de charge de l'ion considéré, ce qui semble contredire le phénomène précédent concernant le

Fragments	O ³⁺ (30 keV)	Ar ⁸⁺ (80 keV)	Électrons (70 eV)
FeTPPCl ⁺	10 000	10 000	500
FeTPP ⁺	6 891	6 575	10 000
(FeTPP–Phe) ⁺	272	183	650
(FeTPP–2Phe) ⁺	174	197	250
FeTPPCl ²⁺	2 971	3 551	-
FeTPP ²⁺	10 133	7 794	1 400
(FeTPP–Phe) ²⁺	3 688	6 442	700
(FeTPP–2Phe) ²⁺	837	1 576	650
FeTPPCl ³⁺	99	61	-
FeTPP ³⁺	607	655	-
(FeTPP–Phe) ³⁺	370	-	-
(FeTPP–2Phe) ³⁺	-	-	-
Petits fragments	88 787	129 425	-

TABLE 3.3 – *Intensités relatives des différentes espèces produites après collisions de FeTPPCl avec des ions multichargés (O³⁺ et Ar⁸⁺ à 10 keV/q) et des électrons (70 eV d'énergie cinétique).*

chlore. Une explication peut toutefois être formulée, si l'on considère les biomolécules doublement chargées qui ont perdu un ou deux groupes phenyl, c'est-à-dire : (FeTPP–Phe)²⁺ et (FeTPP–2Phe)²⁺. En effet, il est légitime de penser que les pics de ces deux espèces reçoivent également une contribution de la part des molécules plus hautement chargées qui ont perdu un groupement phenyl chargé. Ainsi, une fragmentation du type :



qui initialement provient de la formation de l'espèce FeTPP³⁺ apportera une contribution au pic de (FeTPP–Phe)²⁺ par sa formation lors de la réaction précédente.

Enfin, l'état de charge maximum que peut porter la molécule est indépendant du projectile considéré et ne dépasse pas $q = 4$. Cette valeur correspond donc à la charge critique que supporte le système et pour $q > 4$, l'instabilité de charge est atteinte, provoquant la destruction de la molécule. Remarquons que dans le cas des études portant sur les agrégats d'atomes, il est possible de calculer théoriquement cette limite en comparant l'énergie de cohésion à celle nécessaire à la dissociation de l'édifice [62]. Dans le cas des biomolécules, ce type de calcul est bien plus complexe, car il exige de connaître la surface de potentiel de la molécule. Ce type de calcul n'est pas particulièrement évident sur des systèmes de cette taille. Il est, par conséquent, difficile de faire une analogie avec les méthodes utilisées pour les agrégats d'atomes.

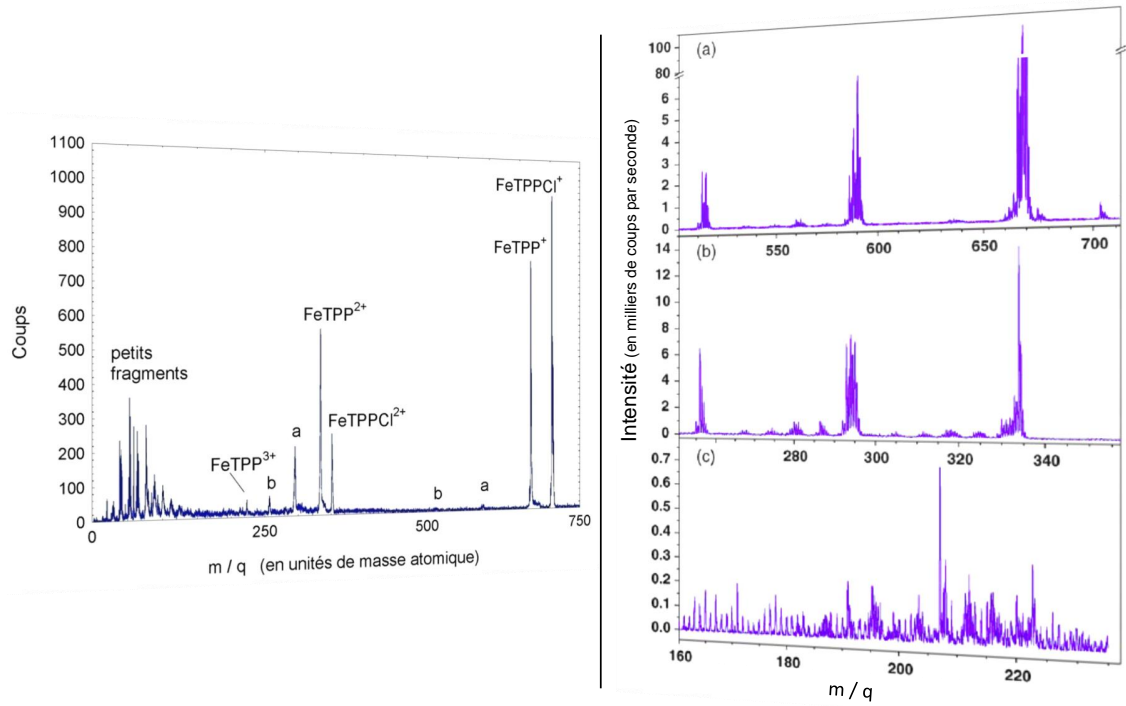
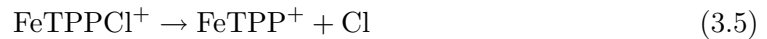


FIGURE 3.10 – Comparaison de deux spectres de fragmentation de la molécule FeTPP provenant, sur la figure de gauche, de collisions avec des ions multichargés (O^{3+} à 30 keV) et, sur la figure de droite, de l'interaction avec des électrons à 70 eV (spectre provenant de la référence [56]).

Processus de fragmentation retardée

Une analyse plus détaillée du spectre, présenté à la figure 3.6, permet en outre de mettre en évidence des effets plus fins liés à la fragmentation et qui interviennent sur des échelles de temps plus importantes.

Un premier exemple de ce type de processus retardé est visible sur la figure 3.11, où l'on représente la zone située entre le pic de FeTPPCl⁺ (à droite et non visible sur la figure) et le pic de FeTPP⁺ (centré sur le canal 7505). A droite de ce dernier pic, on constate la présence d'un épaulement qui s'étend sur des temps de vol plus grands et qui est attribué à la perte de l'atome de chlore sur une échelle de temps de l'ordre de quelques microsecondes. Ce processus correspond donc au processus suivant :



Il est possible de mieux comprendre cette observation en s'intéressant plus particulièrement à la durée de cet épaulement. Grâce à un calcul analytique [62] réalisé par un programme Mathematica⁶, nous pouvons déterminer la limite de cet épaulement sur le spectre, qui intervient lorsque la dissociation décrite par l'équation 3.5 se produit à la fin de la première zone de champ électrique du spectromètre à temps de vol (voir figure 3.5). Il est donc possible d'attribuer cette contribution au spectre par une fragmentation retardée de l'espèce FeTPPCl⁺, qui intervient dans la première région d'extraction du spectromètre

6. <http://www.wolfram.com/>

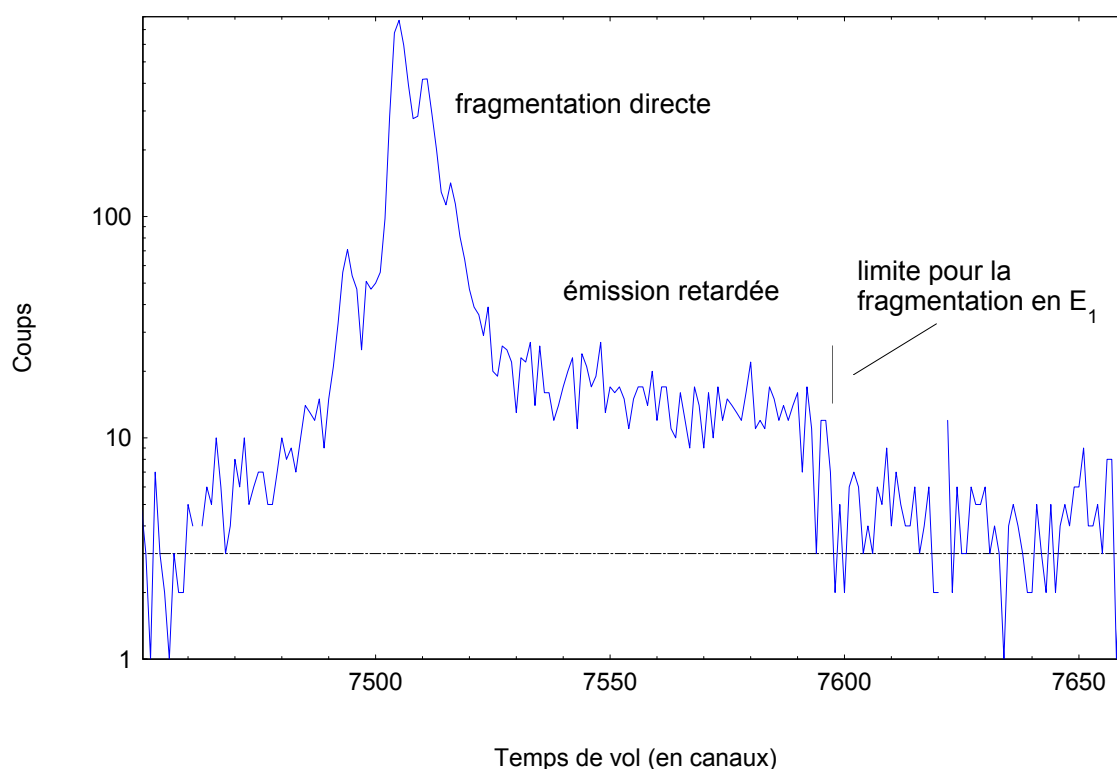


FIGURE 3.11 — Vue du pic de FeTPP^+ montrant la fragmentation directe et celle retardée qui intervient à des temps inférieurs à 10 secondes.

à temps de vol.

Compte tenu de cette explication, il paraît légitime de s'interroger sur la possibilité qu'un processus similaire puisse intervenir dans la deuxième région de champ du spectromètre (voir figure 3.5). Ceci conduirait alors à la formation d'un autre épaulement que nous devrions détecter. Le spectre ne laisse pas apparaître un tel phénomène. Ceci s'explique par le fait que le temps passé dans cette seconde région de champ est beaucoup plus court que dans la zone précédente, mais aussi parce que l'épaulement d'une fragmentation retardée se produisant dans cette zone doit s'étendre jusqu'au pic de la molécule intacte. Le niveau du signal attendu est donc très faible et il n'est pas détectable sur les spectres.

Nous avons ainsi pu établir que le rapport entre la dissociation retardée de la molécule ionisée et la dissociation directe est égal à 10 %. Le temps de vie caractéristique du processus de fragmentation retardée est, quant à lui, égal à 8 μs . La détermination de ce temps peut également être étendue aux espèces doublement et triplement chargées et l'on trouve dans ces cas respectifs : 4,5 et 2,6 μs .

L'étude des espèces doublement chargées montre des phénomènes encore plus riches. En se focalisant sur deux systèmes doublement ionisés que constituent FeTPPCl^{2+} et FeTPP^{2+} (figure 3.12), on peut identifier la présence de deux processus différents. On retrouve, en particulier, la présence d'un épaulement adossé au pic représentant FeTPP^{2+} dont l'origine est une émission retardée d'un chlore neutre :

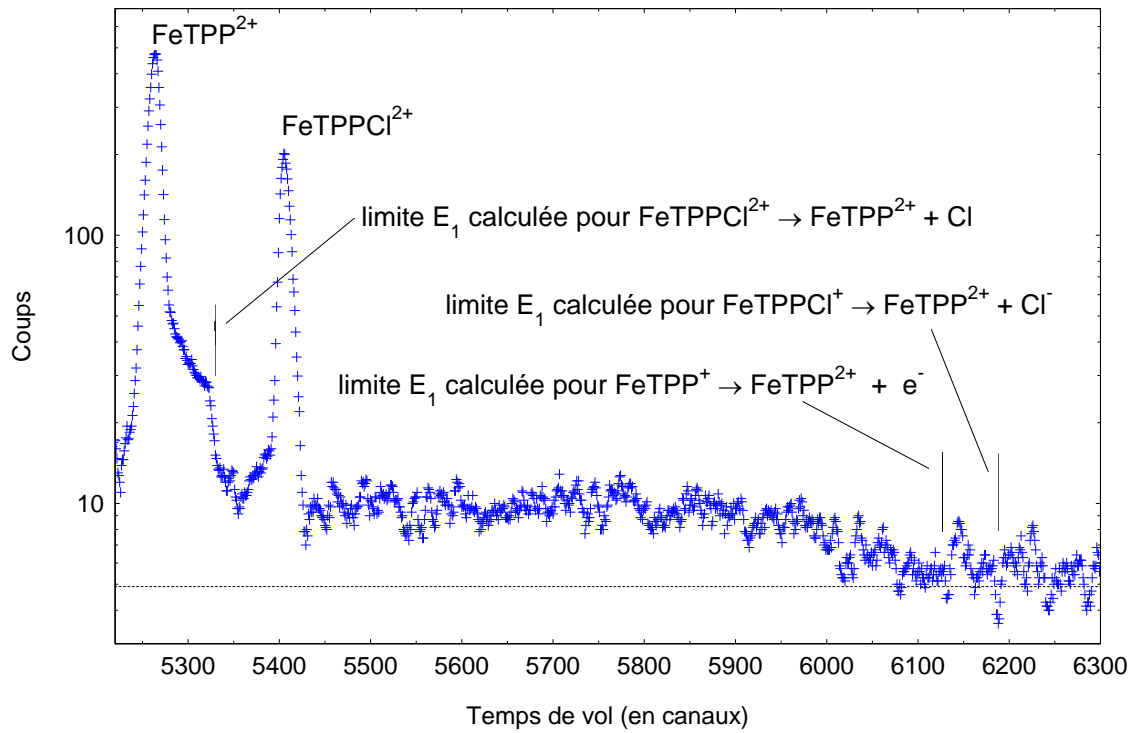
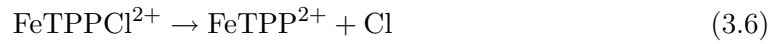


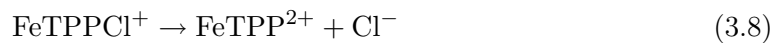
FIGURE 3.12 — Formes des pics de FeTPP^{2+} et $\text{FeTPP}^{2+}\text{Cl}^{2+}$. Les barres verticales indiquent la fin temporelle calculable pour les processus mentionnés. La ligne en pointillés représente le niveau de bruit du spectre.



Néanmoins, on constate également qu'un second processus de fragmentation retardée est présent, bien que plus difficilement discernable. Il est caractérisé par un épaulement beaucoup plus large et s'étend sur des temps de vol plus longs que ceux rencontrés dans le premier type de dissociation retardée que nous avons évoqué jusqu'alors. Il est possible d'expliquer cette observation par la perte d'une espèce chargée. Il peut s'agir soit de l'émission d'un électron qui proviendrait de la molécule une fois chargée (FeTPP^{+}) qui a précédemment perdu un atome de chlore neutre (voir réaction 3.7), soit de l'émission directe de Cl^{-} dans une réaction de dissociation du type 3.8 :



ou

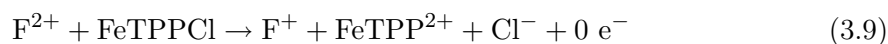


Théoriquement, il est possible de distinguer ces deux cas. En effet, les deux réactions ne font pas intervenir les deux mêmes espèces chargées, e^{-} pour la réaction 3.7 et Cl^{-} dans la réaction 3.8. Il s'ensuit que le temps maximal pendant lequel chacune de ces deux espèces ressentira le champ électrique de la première région du spectromètre n'est pas le

même. De fait, il est possible de calculer, dans les deux cas, la durée maximale que peut avoir l'épaule observé sur le spectre. Le résultat de ce calcul est visible sur la figure 3.12. Néanmoins, la statistique relativement limitée obtenue sur cet effet ne permet pas de donner une réponse définitive.

Quoiqu'il en soit, il faut bien voir que ce type de réaction est assez inattendu. En effet, il est surprenant qu'un système initialement chargé une seule fois puisse émettre une particule négative, augmentant alors son propre état de charge.

Afin de confirmer cette observation, nous avons effectué une expérience complémentaire en collaboration avec l'équipe de Serge Martin à Lyon. Un schéma du dispositif expérimental utilisé [31, 63] (dans le principe assez similaire au dispositif précédemment décrit) est visible sur la figure 3.13. La molécule de FeTPPCl est évaporée dans un four et la vapeur de biomolécules neutres interagit avec le faisceau d'ions multichargés. Les fragments positifs sont détectés grâce à un spectromètre à temps de vol équipé d'un détecteur sensible à la position des fragments (comptant 121 pixels). L'originalité de l'expérience réside dans le fait qu'il est possible d'avoir accès au nombre d'électrons émis lors de la collision grâce à un détecteur d'électrons (PIPS⁷) placé à l'opposé du spectromètre. Il collecte les électrons émis par la cible biomoléculaire et qui ne sont pas stabilisés par le projectile. En face du faisceau d'ions multichargés, un analyseur électrostatique permet de ne sélectionner, pour cette expérience, que le projectile ayant capturé un électron de la biomolécule. Si les ions du faisceau initial possèdent une charge q , alors, l'analyseur électrostatique ne laissera passer que les ions $q - 1$. La détection de ces ions est assurée par un channeltron. Contrairement à l'expérience caennaise, le faisceau d'ions n'est pas pulsé. L'extraction des fragments positifs et la détection des électrons se font de manière continue. Néanmoins, les signaux issus des détecteurs ne sont pas enregistrés dans leur intégralité. L'acquisition est déclenchée uniquement lors de la détection d'un ion de charge $q - 1$. Le système d'acquisition enregistre alors la position et le temps de vol des fragments positifs et en parallèle le nombre d'électrons émis. Ainsi, cette expérience permet d'avoir accès, en multi-coïncidences, à trois des quatre partenaires chargés de la réaction suivante :



En effet, bien qu'il ne soit pas possible de détecter le fragment négatif Cl^- , cette expérience permet de détecter en coïncidence l'espèce FeTPP^{2+} , l'ion projectile F^+ qui a stabilisé un électron et l'absence d'émission d'un électron, ce qui permet de signer sans ambiguïté la formation du Cl^- . Malheureusement, la résolution du signal provenant du PIPS ne nous a pas permis d'identifier clairement l'absence d'émission d'un électron dans ce processus. Toutefois, nous avons conclu que l'émission de Cl^- liée à la formation de FeTPP^{2+} , si elle existe, est un phénomène très peu probable. Cette voie particulière ne représenterait au plus que 10% de l'ensemble des voies de dissociation conduisant à la formation de FeTPP^{2+} ; sinon, nous aurions été en mesure de mettre en évidence l'absence

7. PIPS : *Passivated Implanted Planar Silicon*. Les électrons sont accélérés par une différence de potentiel de l'ordre de 17 – 20 kV.

d'émission d'électrons compte tenu de la résolution obtenue lors de cette expérience.

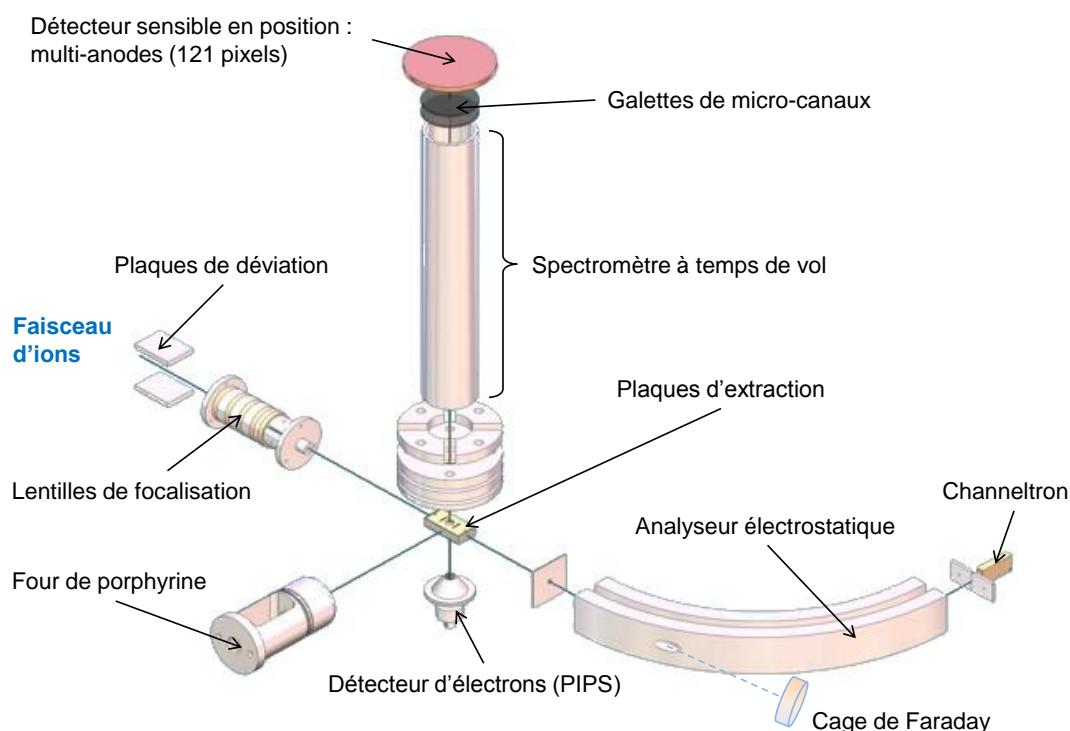


FIGURE 3.13 – Dispositif expérimental de l'équipe de Serge Martin (Lyon) utilisé pour compléter nos résultats sur la fragmentation retardée de la porphyrine.

Petits fragments multiement chargés

La description générale du spectre de la figure 3.6 a d'ores et déjà permis de mettre en évidence le fait qu'un nombre important de petits fragments ($m/q < 100$) sont formés lors de la collision avec des ions multichargés.

La figure 3.14 représente deux spectres obtenus suite à des collisions avec des projectiles O^{3+} , Ar^{8+} , sur un intervalle de masses compris entre 20 et 80 u.m.a.. Elle met en évidence les fragments du type $C_nH_m^+$ ainsi que la présence de fragments atomiques tels que Fe^+ et Cl^+ . On peut remarquer que la distribution des fragments a tendance à être légèrement déplacée vers ceux de tailles plus petites lorsque l'état de charge du projectile augmente. C'est ainsi, par exemple, que des fragments C_2^+ , absent du spectre d' O^{3+} , deviennent dominants dans le groupe C_2H_m du spectre d' Ar^{8+} . Cette différence dans la distribution devient encore plus évidente dans le cas des fragments de rapport m/q plus faible.

La figure 3.15 présente les principaux fragments de moins de 20 u.m.a. obtenus lorsque FeTPPCl est ionisée par des ions Ar^{8+} à 80 keV d'énergie cinétique. Le pic d' H_2O^+ ainsi que la présence d' OH^+ et d' O^+ s'expliquent par l'interaction du faisceau d'ions avec le gaz résiduel. Mis à part l'eau, le spectre est dominé par la présence d'un pic élargi contenant essentiellement les ions C^+ ($m/q = 12$), mais également des contributions de Cl^{3+} .

Enfin, une comparaison intéressante peut être faite en ce qui concerne les fragments ato-

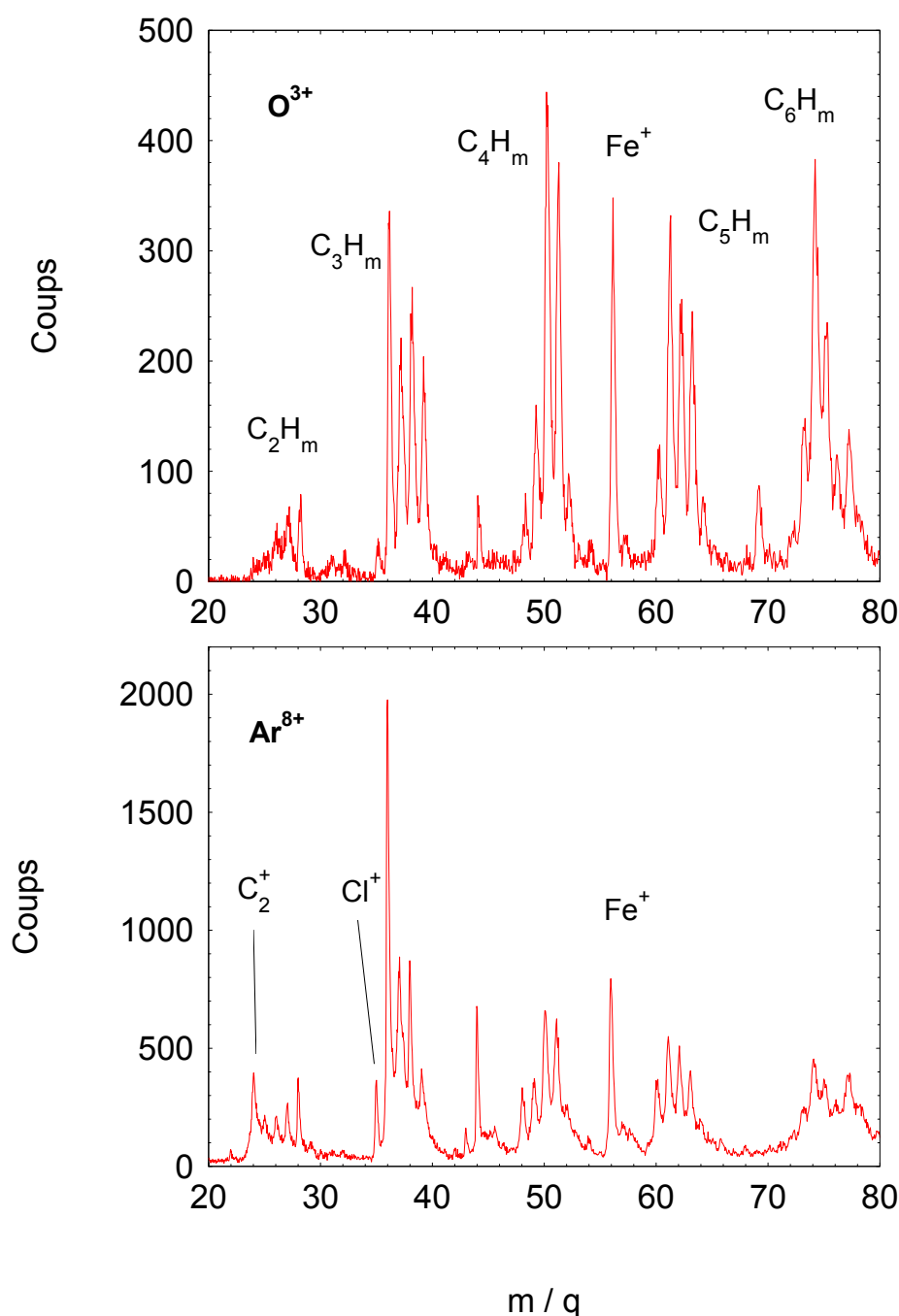


FIGURE 3.14 – Comparaison des petits fragments positifs de la molécule de FeTPPCl produits dans le cas d'une collision avec O^{3+} à 30 keV et Ar^{8+} à 80 keV.

miques multi-ionisés de chlore et de carbone. L'observation des différents spectres ne fait apparaître que des fragments de carbone au plus doublement chargés (en très petit nombre dans ce dernier cas). La géométrie de la molécule peut probablement expliquer en partie ce constat. En effet, les carbones multiement chargés devraient être créés suite à la capture de plusieurs électrons par les ions multichargés. Or, la présence de cycles benzéniques dans la structure de la molécule favorise une bonne conduction électrique entre les atomes de carbone, permettant de répartir rapidement l'excès de charges avant une éventuelle ato-

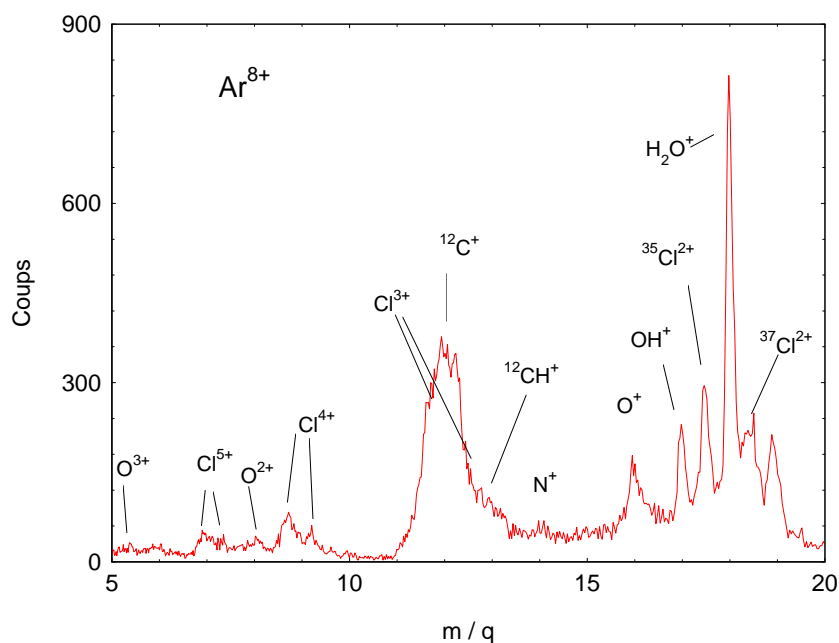


FIGURE 3.15 – Spectre montrant les petits fragments positifs formés lors de la collision de la molécule de porphyrine avec Ar^{8+} à 80 keV.

misation de la molécule. Cet effet, déjà observé dans de nombreux systèmes carbonés (par exemple dans le cas de la fragmentation de C_{60} [64]) pourrait expliquer la prédominance de carbones simplement chargés dans les spectres de masse. *A contrario*, le chlore est présent jusqu'à une charge égale à 6 comme le montre la figure 3.16, dans laquelle les intensités relatives des deux espèces sont représentées en fonction de q .

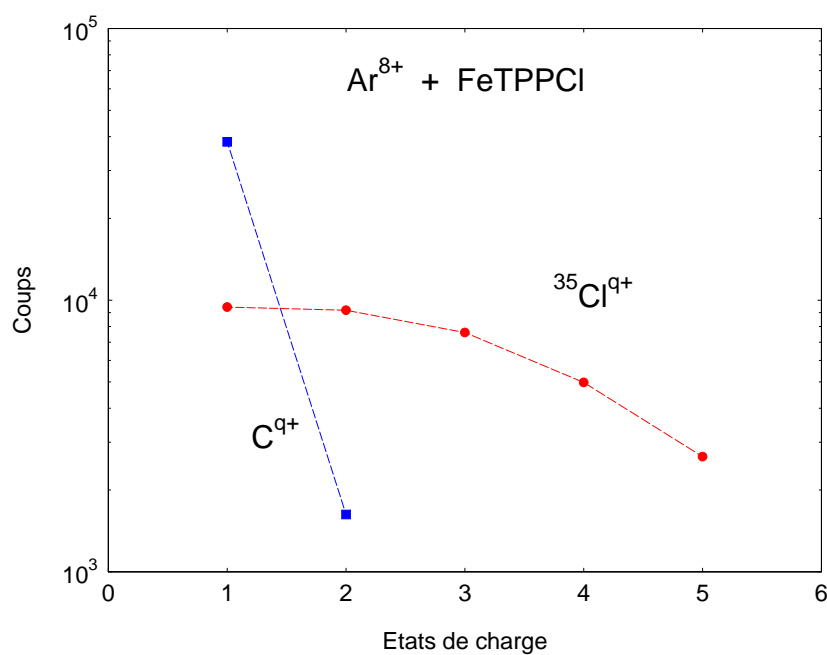


FIGURE 3.16 – Intensités des ions carbone et chlore en fonction de leur état de charge. Les données sont extraites du spectre de la figure 3.15

La formation d'états de charge aussi importants pourrait s'expliquer par la configuration électronique des deux atomes ($2s^2 2p^2$ dans l'état fondamental pour le carbone et $3s^2 3p^5$ pour le chlore) et par une mauvaise conduction électronique au niveau de la liaison entre le chlore et le fer. En particulier, nous savons que l'atome de chlore est faiblement lié à l'atome central de fer, comme en témoigne la prédominance de cette voie de dissociation (perte de Cl) dans les spectres et ce, même à très faible énergie d'excitation. Ainsi, contrairement au cas du carbone, le charge supportée par l'atome de chlore ne pourrait être transférée au macrocycle de la molécule, expliquant la formation de forts états de charge pour cet atome.

3.2 Expériences réalisées avec collisions dans un gaz d'atomes alcalins

Dans le cadre des collaborations mises en place par le réseau ITS LEIF⁸, nous avons pu effectuer trois expériences avec l'équipe de Preben Hvelplund à l'Université d'Aarhus (Danemark). Nous présentons dans cette seconde partie, une autre expérience sur une molécule d'intérêt biologique isolée, de la même famille que FeTPPCL. Nous décrivons ici le dispositif expérimental qui nous a permis de les réaliser. Contrairement au dispositif de Caen, les expériences d'Aarhus n'utilisent pas d'ions multichargés de basse énergie. À Caen, cet outil permet d'arracher des électrons au système biomoléculaire, et d'étudier la fragmentation qui en résulte. À l'inverse, l'idée des expériences de cette collaboration avec le Danemark est d'induire la capture d'un ou de deux électrons supplémentaires par un ion biomoléculaire. On s'intéresse alors à la fragmentation due à la présence de cet excès de charge. Cette technique expérimentale est appelée dissociation induite par capture électronique (*ECID* pour *Electron Capture Induced Dissociation*) [65–67].

Dans cette expérience, nous avons utilisé la molécule de protoporphyrine IX (abrégée PP dans la suite), qui est une autre molécule de la famille des porphyrines. Elle possède un macrocycle similaire à la molécule de FeTPPCL étudiée précédemment et ne diffère donc que par les groupements attachés à son cœur tétrapyrrolique. La molécule PP est représentée sur la figure 3.18. Cette molécule intervient directement dans le corps humain, puisque la coordination de fer sur la protoporphyrine forme l'hème qui constitue la base des protéines hémoglobine et myoglobine. Ces deux protéines se retrouvent dans les hématies et dans les tissus musculaires⁹ et assurent le transport dans l'organisme du dioxygène fixé à l'atome de fer.

3.2.1 Dispositif expérimental d'Aarhus

Le dispositif expérimental de l'Université d'Aarhus, sur lequel nous avons travaillé, est présenté de façon schématique sur la figure 3.17 [68, 69].

Les ions biomoléculaires sont produits par une source electrospray. La source que j'ai développée pendant ma thèse est basée sur le même concept. Par conséquent, la description et les détails techniques de cette source electrospray sont donnés dans la partie IV page 145. Elle est installée sur une plate-forme haute tension qui permet d'accélérer les ions produits à une énergie de 50 keV. Les ions sont acheminés par la ligne de transport, où règne un vide résiduel de l'ordre de 10^{-6} mbar, jusqu'à un aimant. Il s'agit d'un secteur magnétique de 72° et de 2 mètres de rayon. Il permet d'effectuer une sélection des ions biomoléculaires en fonction de leur rapport m/q . Les ions biomoléculaires ainsi accélérés et triés en masse interagissent avec un gaz atomique contenu dans une cellule de collision de 3 cm de long. La cellule cible est équipée d'un pompage différentiel et de deux diaphragmes en entrée et en sortie de 1 et 2 mm de diamètre respectivement. Suivant le type d'interaction que l'on souhaite produire, deux types de gaz différents sont utilisés. Si l'on s'intéresse à la

8. *Ion Technology and Spectroscopy at Low Energy Ion beam Facilities*

9. À titre informatif, c'est la quantité de myoglobines présentes dans les muscles qui donne la distinction entre la viande blanche et la viande rouge.

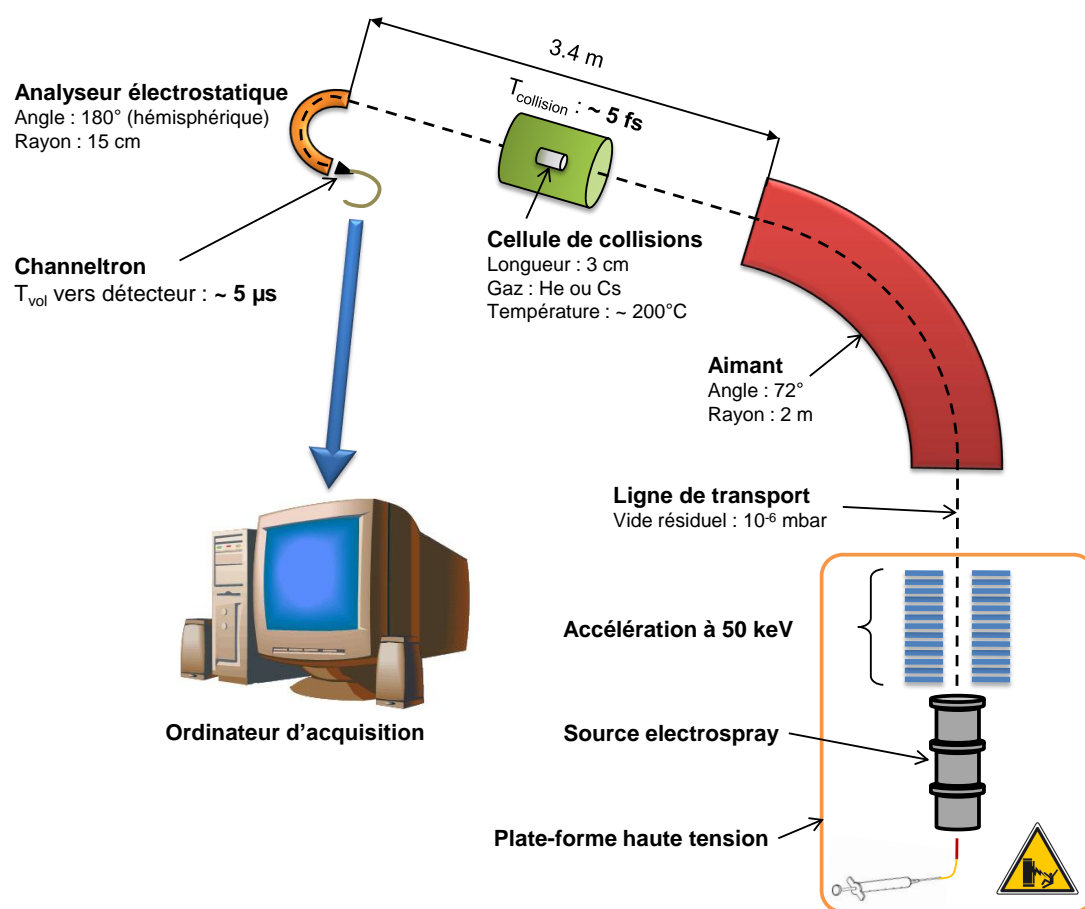


FIGURE 3.17 – Schéma du dispositif expérimental de l'Université d'Aarhus. On peut noter que le temps d'interaction (quelques fs) est du même ordre de grandeur que celui obtenu dans le cas des ions multichargés (par exemple avec O^{5+} à 50 keV). La fragmentation est observée sur une échelle de temps de quelques microsecondes.

CID (*Collision Induced Dissociation* : dissociation induite par la collision), on utilise un gaz rare (hélium ou néon) avec lequel la capture d'un électron par l'ion biomoléculaire est un processus très improbable. Au contraire, lorsqu'on s'intéresse à la fragmentation qui résulte de la capture électronique, on introduit un gaz alcalin dans la cellule (sodium ou césium). L'électron de valence de la couche s (3s pour le sodium et 6s pour le césium) est alors transféré à l'ion biomoléculaire avec une grande probabilité. Le temps moyen d'interaction entre les atomes du gaz et le faisceau de biomolécules (à 50 keV d'énergie cinétique) est de l'ordre de quelques femtosecondes et est comparable à celui des collisions avec les ions multichargés de basse énergie (généralement 10 keV/ q). On peut donc considérer qu'il s'agit de processus d'ionisation verticale. Les fragments, issus de la collision avec la cible gazeuse, sont ensuite analysés en fonction de leur rapport énergie sur charge (E/q) par un analyseur électrostatique. Les espèces, formées lors de la collision, parcourent une distance de 700 mm entre la cellule de collision et l'entrée de l'analyseur. À l'entrée de ce dernier est disposé un diaphragme de 10 mm de diamètre, ce qui conduit à un angle d'acceptance de $0,4^\circ$. L'analyseur possède une géométrie hémisphérique (180°) et un rayon de 15 cm. La séparation des électrodes est de 15 mm. Afin d'obtenir un spectre de fragmentation, une

rampe de tension est appliquée sur les faces de l'analyseur de façon à scanner les différents rapports E/q . Les fragments chargés qui possèdent le bon rapport passent à travers l'analyseur et sont détectés grâce à un channeltron fonctionnant en mode comptage. Une fente de 1 mm est placée entre la sortie de l'analyseur et l'anode du channeltron afin d'améliorer la résolution du système de détection. La rampe, qui alimente les électrodes de l'analyseur, est subdivisée en pas de tension fixes, pendant lesquels le système d'acquisition enregistre le nombre de coups détectés. Le temps de vol entre la fin de la cellule de collision et le détecteur est de l'ordre de quelques μs . Ce temps correspond donc à l'échelle de temps sur laquelle les processus de fragmentation sont observés. De plus, comme le transfert d'énergie lors de la collision est petit (quelques eV), l'énergie est directement proportionnelle à la masse pour ces fragments de haute énergie. La tension de déflexion appliquée sur l'analyseur est donc une mesure du rapport m/q . Le spectre en énergie peut ainsi être converti en rapport m/q .

Concernant la production des ions, nous avons réalisé une première série d'expériences avec le cation protoné $[\text{PP}+\text{H}]^+$ et une seconde avec l'anion déprotoné $[\text{PP}-\text{H}]^-$ (voir figure 3.18). Dans le premier cas, la poudre a été dissoute dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol (en proportion 1 : 1), alors que dans le second, la formation d'espèces négatives intervient dans du méthanol auquel on ajoute 1% d'acide acétique ce qui permet de déprotonner la molécule.

La source electrospray est une technique d'ionisation douce : elle forme donc des biomolécules chargées, contrairement à la technique du four utilisée à Caen qui conduit à un jet de biomolécules neutres. Associé au fait qu'il ne s'agit pas exactement de la même molécule, les résultats obtenus dans cette expérience ne peuvent donc pas être directement comparés à ceux obtenus à Caen avec FeTPPCl . En revanche, nous pouvons, ici aussi, en tirer des conclusions générales sur la stabilité des porphyrines soumises à une excitation intense du cortège électronique.

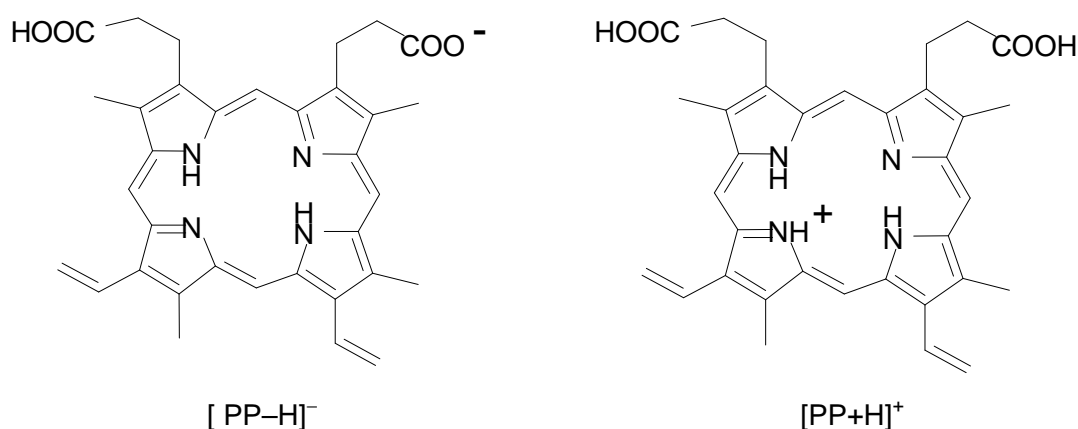


FIGURE 3.18 — Schéma de l'anion (à gauche) formé dans un mélange d'acide acétique et de méthanol. Le cation (à droite) est produit dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol.

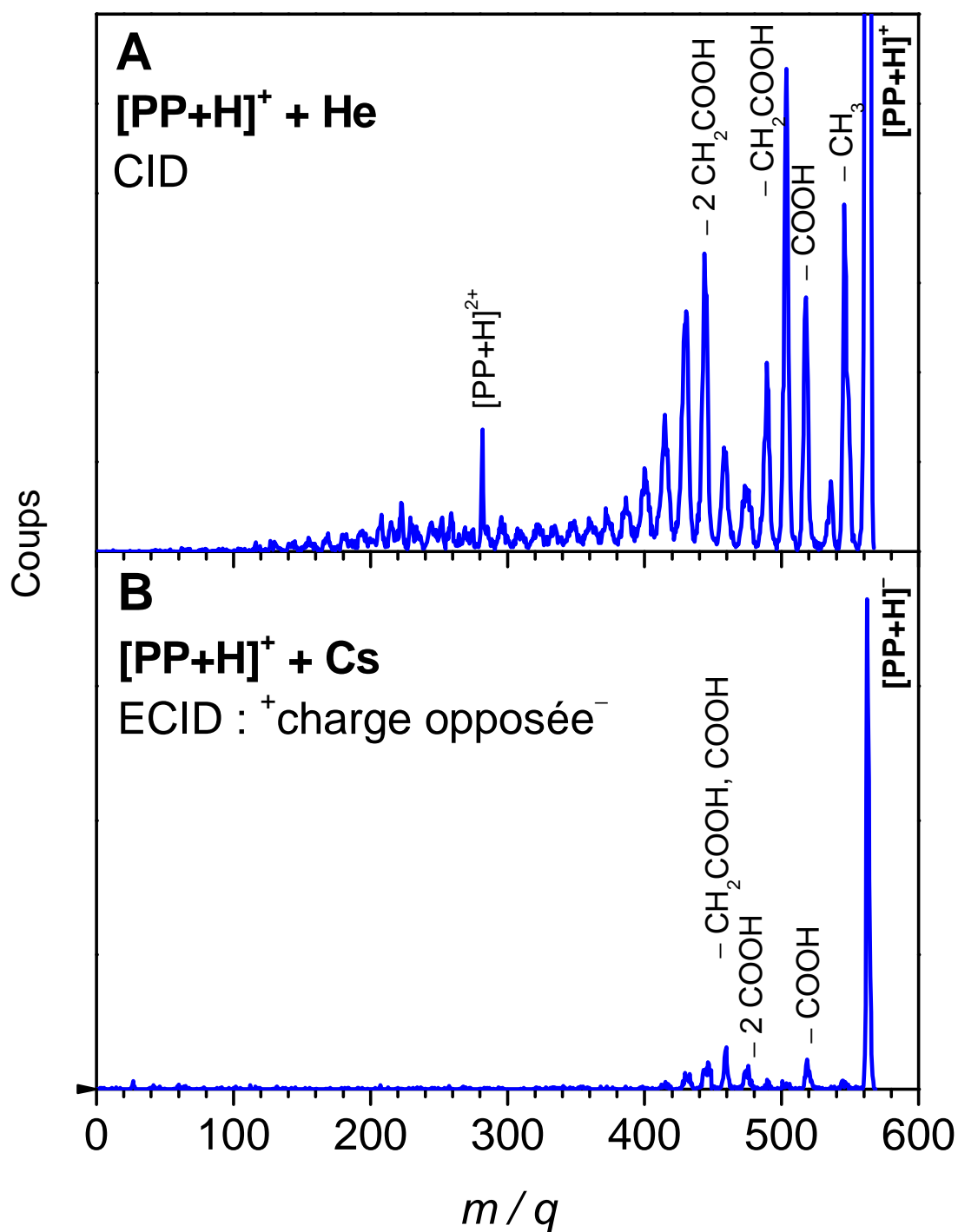


FIGURE 3.19 – Spectres de fragmentation obtenus dans le cas de collisions entre les cations $[\text{PP}+\text{H}]^+$ et un gaz d'hélium (A) ou de césium (B). Remarquons que dans le cas A, on détecte les fragments positifs, alors que dans le cas B, on s'intéresse aux produits négatifs (détection de la charge opposée) formés par inversion de charge lors de deux captures électroniques.

3.2.2 Résultats et discussions

Nous considérons d'abord les résultats obtenus avec les ions positifs $[PP+H]^+$. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au phénomène de CID. Nous avons réalisé un spectre de fragmentation provenant de la collision entre les cations de protoporphyrine IX (de rapport $m/q = 563$) et un gaz d'hélium. Le spectre est présenté sur la figure 3.19-A. Le pic principal du spectre est celui du cation de la molécule de protoporphyrine intacte. Le fragment majoritaire correspond à la perte de CH_2COOH ($m/q = 59$), qui est la voie de dissociation de plus faible énergie selon les travaux de Charkin et coll. [70, 71]. Les autres fragments principaux proviennent de la cassure de groupements des chaînes latérales. En particulier, on observe la molécule de protoporphyrine IX ayant perdu les espèces CH_3 ($m/q = 15$), $COOH$ ($m/q = 45$) et $2 CH_2COOH$ ($m/q = 118$). On constate donc que le macrocycle n'est pas sujet à la dissociation induite par collision ce qui confirme que son énergie de cohésion est particulièrement élevée. De façon surprenante, on observe également un pic au centre du spectre qui est attribué à la présence de la protoporphyrine doublement chargée ($[PP+H]^{2+}$). La formation de ce dication implique la perte d'un électron supplémentaire. On peut supposer que ce sont les collisions avec le dioxygène présent dans les lignes de transport (vide résiduel de 10^{-6} mbar) qui induisent l'arrachement de cet électron à la biomolécule [72].

Dans un second temps, nous avons remplacé l'hélium contenu dans la cellule de collisions par du césium. Comme la molécule de protoporphyrine IX est chargée une fois positivement, une collision avec le césium va conduire à la formation d'une biomolécule neutre. L'idée est alors d'augmenter la densité de gaz de façon à se placer dans une configuration où la capture électronique double (capture électronique sur deux atomes différents) est fortement probable. Ainsi, deux collisions successives avec le césium vont conduire à la formation d'anions comme le montre le schéma de la figure 3.20. Le spectre, dit de « charge opposée », issu de cette expérience est présenté sur la figure 3.19-B.

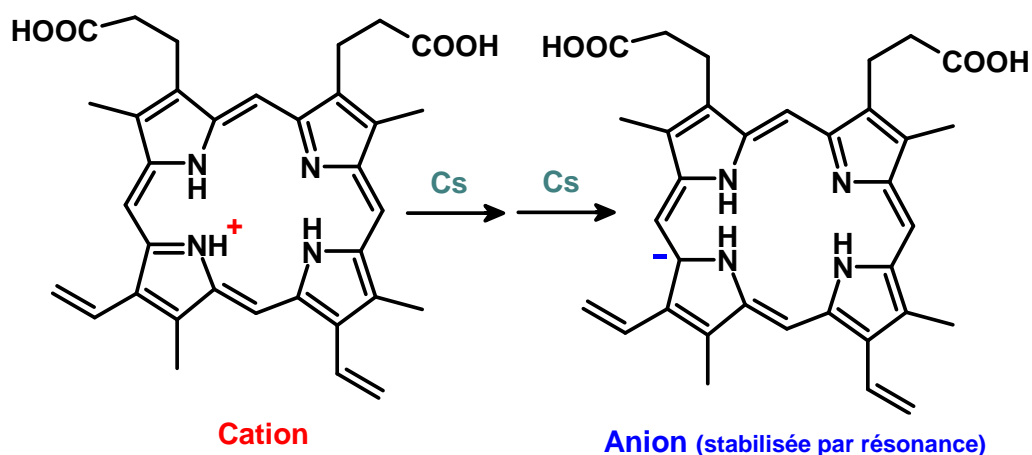


FIGURE 3.20 – La capture électronique double conduit à la formation de l'anion $[PP+H]^-$ à partir du cation $[PP+H]^+$.

Il montre que l'anion dominant est l'espèce $[PP+H]^-$ ($m/q = 563$) qui correspond à la

molécule intacte. Ainsi, la protoporphyrine IX protonée peut s'accommoder de la présence de deux électrons dans son orbitale LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Cela ne semble conduire à aucune dissociation sur une échelle de temps de quelques microsecondes. Pour vérifier ceci, nous avons effectué un spectre avec une meilleure résolution centré sur le pic de $[\text{PP}+\text{H}]^-$, de façon à pouvoir en décomposer la structure. C'est ce que représente la courbe bleue de la figure 3.21-B. Pour comparaison, la figure 3.21-A est une vue agrandie du pic du cation parent $[\text{PP}+\text{H}]^+$ obtenue en l'absence de gaz dans la cellule de collisions. Nous avons reproduit le spectre de la figure 3.21-A à l'aide d'une gaussienne (traits pointillés noirs). Sur la figure 3.21-B, le pic présente une queue en direction des petites masses. Cette allure peut s'expliquer par la perte d'un atome d'hydrogène lors de la collision, ce qui conduit à un anion de masse 562. Nous avons tracé deux gaussiennes centrées en $m/q = 563$ (en violet) et $m/q = 562$ (en vert). La somme de ces deux fonctions permet d'obtenir la courbe en pointillés noirs qui retrace l'allure générale du pic. Il est alors possible de calculer le rapport entre les deux gaussiennes de façon à obtenir une estimation de la proportion d'anion ayant perdu un hydrogène. Le rapport de l'intégrale du pic $m/q = 562$ sur celle du pic centrée en $m/q = 563$ est égale à $1/8$.

Nous avons cherché à confirmer l'hypothèse de la perte d'un atome d'hydrogène en produisant des cations $[\text{PP}+\text{H}]^+$ deutérés. Nous avons ainsi préparé une solution de protoporphyrine IX en utilisant CH_3OD à la place de CH_3OH comme solvant. Le nombre maximal de protons qui peuvent être échangés est égal à 5. En effet, comme le montre le schéma de droite de la figure 3.18, 3 protons proviennent des groupes NH et 2 de COOH. Grâce à l'aimant, il est possible de sélectionner le cation $[\text{PP}+\text{H}]^+$, quatre fois deutéré de masse 567 que nous noterons $[\text{PP}+\text{H}]^+ - \text{D}_4$. Le faisceau de biomolécules deutérées interagit ensuite avec les atomes de césium contenus dans la cellule de collisions. Le spectre des fragments formés lors de la collision est alors enregistré. La figure 3.22 montre la région autour de $m/q = 567$ qui correspond à la formation de $[\text{PP}+\text{H}]^- - \text{D}_4$ suite à la capture de deux électrons par $[\text{PP}+\text{H}]^+ - \text{D}_4$. Un ajustement gaussien (en violet) reproduit le pic de $[\text{PP}+\text{H}]^- - \text{D}_4$. De façon à reproduire la forme générale du pic, nous avons eu recours à deux autres gaussiennes qui mettent en évidence la perte d'hydrogène (en vert) et de deutérium (en orange).

Ceci corrobore donc l'hypothèse que nous avons formulée précédemment, selon laquelle la formation de l'anion par double capture électronique s'accompagne d'une perte d'hydrogène (bien qu'en faible proportion).

Sur le spectre 3.19-B figurent également des ions fragments de plus petites masses (perte de COOH par exemple) dont l'origine peut être expliquée de deux manières différentes. Ils peuvent provenir soit directement de la fragmentation de l'ion parent $[\text{PP}+\text{H}]^+$, soit être issus d'espèces neutres qui vont pouvoir capturer un électron lors d'une collision avec le césium. Ces neutres ont été préalablement formés dans une première collision de $[\text{PP}+\text{H}]^+$ avec un atome de césium sans transfert électronique (CID). Remarquons que l'espèce positive issue de cette première collision pourrait également contibuer aux fragments du spectre de la figure 3.19-B, mais cela nécessiterait deux collisions supplémentaires avec le césium

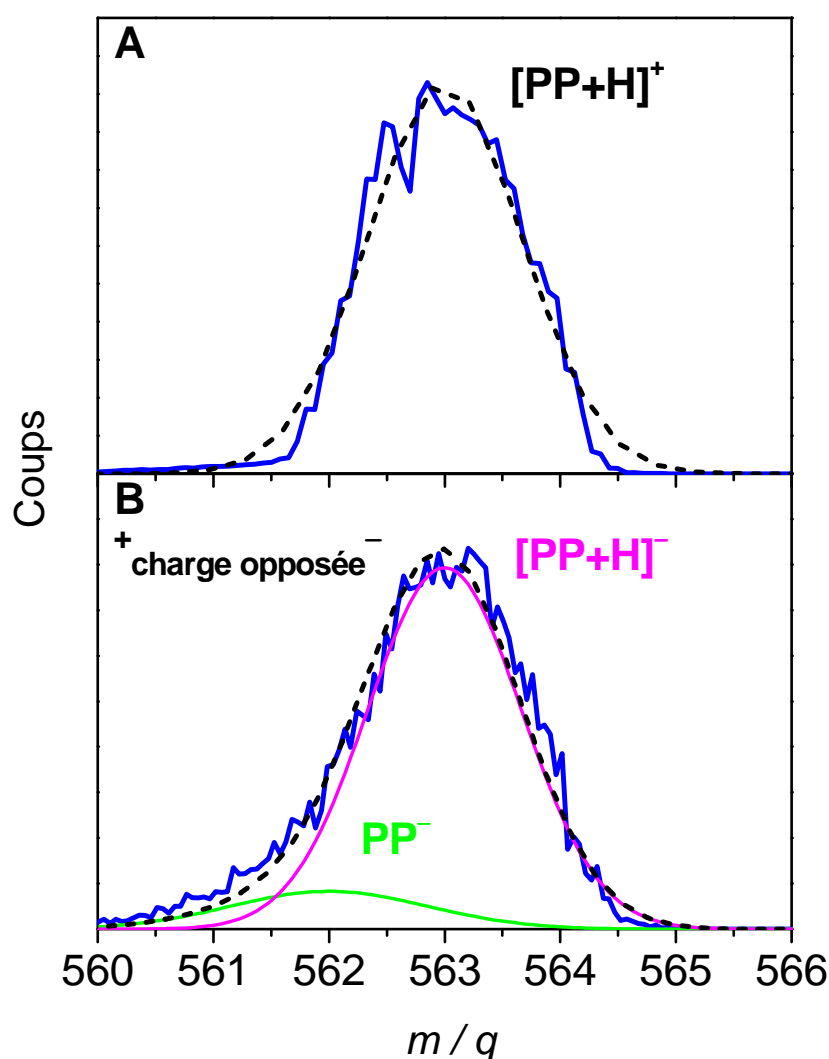


FIGURE 3.21 – Spectres centrés sur la région du cation parent $[PP+H]^+$ $m/q = 563$ (en A). L'anion $[PP+H]^-$ (en violet) est formé après deux collisions avec le césium (en B). Le pic laisse apparaître la perte d'un atome d'hydrogène (en vert).

pour obtenir un ion négatif. La probabilité d'un tel phénomène est très faible.

En conclusion, il convient de noter la stabilité remarquable avec laquelle la molécule parvient à stabiliser deux électrons sans fragmenter. En effet, la somme des fragments chargés négativement du spectre 3.19-B ne représente que 10% de l'intensité totale du spectre. De même, la perte d'hydrogène observée sur le pic de $[PP+H]^-$ reste très modérée (voir figure 3.21-B).

À la suite de ces expériences, nous avons également réalisé des collisions avec des ions négatifs $[PP-H]^-$ de rapport $m/q = 561$. De la même façon que précédemment, nous avons obtenu un premier spectre de fragmentation provenant de l'interaction avec de l'hélium.

Sur la figure 3.23-A, les fragments majoritaires correspondent à la perte de CO_2 . La présence des autres pics provient de la cassure des chaînes latérales du macrocyle avec par exemple la perte de CH_3 et CH_2 . Le spectre de CID peut ensuite être comparé à celui issu de collisions avec des atomes de césium (ECID : *Electron Capture Induced Dissocia-*

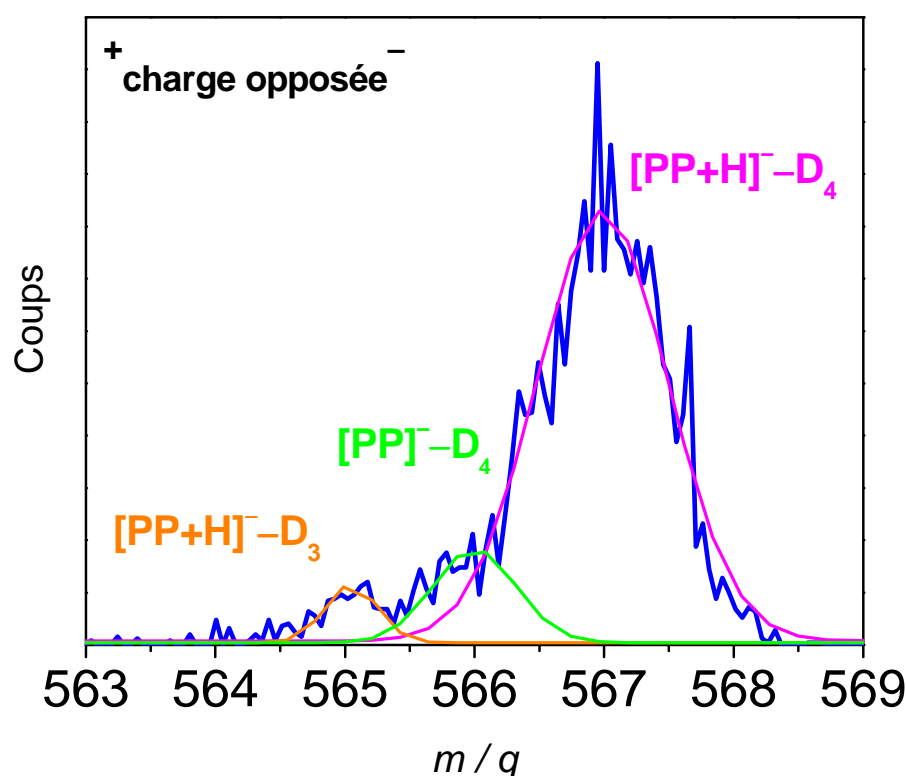


FIGURE 3.22 – Spectre issu de l'expérience de collisions entre le cation deutéré $[PP+H]^+ - D_4$ (auquel 4 des 5 hydrogènes possibles ont été échangés par 4 deutériums) et les atomes de césium. Le pic observé correspond à la formation de $[PP+H]^- - D_4$ (en violet). On distingue la perte d'un atome d'hydrogène (en vert), ainsi que celle d'un deutérium (en orange).

tion), permettant de mettre en évidence les nouveaux pics qui apparaissent (rappelons que la CID est également présente dans les collisions avec le césium) et ainsi d'identifier les voies de fragmentation induites par la capture électronique. Comme on peut le voir sur la figure 3.23-B, deux nouveaux pics apparaissent. Nous les avons attribués en premier lieu au dianion $[PP-H]^{2-}$ ($m/q = 280,5$) et au dianion qui a perdu un groupement $COOH$ ($m/q = 258$). Cependant, comme la molécule de protoporphyrine IX est une molécule symétrique, il est *a priori* possible que ces pics proviennent de la fragmentation symétrique de l'anion, ce qui conduirait également à un pic de rapport m/q très proche. Les résultats des expériences menées avec FeTPPCl et PP tendent à montrer que le macrocycle est particulièrement stable lorsqu'il est soumis à une excitation électronique. Ainsi, la fragmentation que nous venons d'évoquer semble peu probable. Néanmoins, comme la calibration n'est pas suffisamment précise pour distinguer ces deux cas, nous avons réalisé une expérience basée sur le principe de la figure 3.24. La molécule de protoporphyrine IX compte 34 ^{12}C . S'il s'agit d'un dianion, on doit observer un pic au rapport $m/q = 561/2 = 280,5$. Si c'est un fragment simplement chargé, on attend un pic à $m/q = 280$ ou $m/q = 281$ (suivant comment la molécule se dissocie). Ces deux cas de figure ne sont pas évidents à discerner, compte tenu de l'incertitude sur la calibration. Si maintenant, on sélectionne à l'aide de l'aimant un faisceau de masse 562, cela signifie que les biomolécules qui vont entrer en

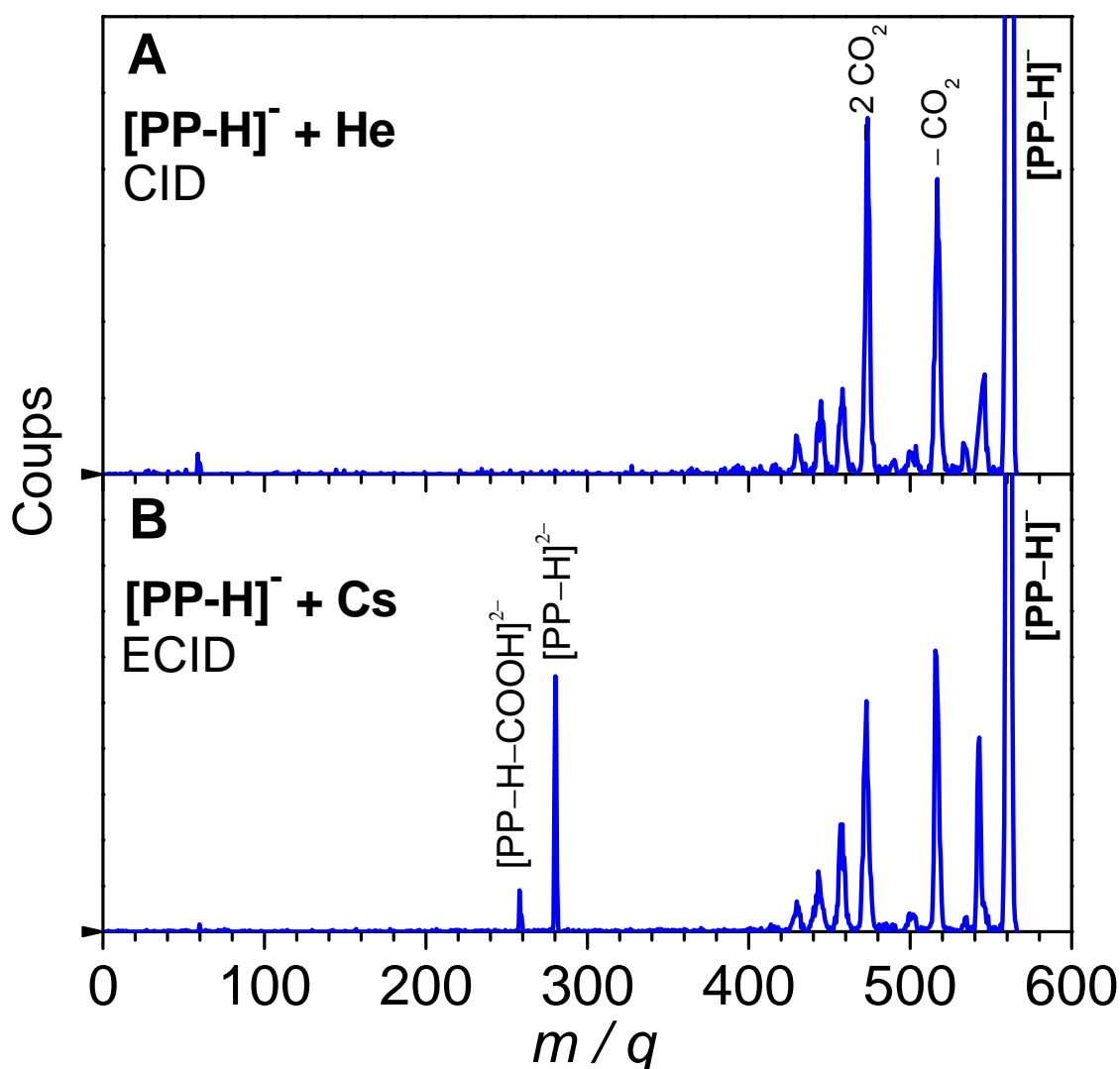


FIGURE 3.23 – Spectres de fragmentation obtenus dans le cas de collisions entre les anions $[PP-H]^-$ et un gaz d'hélium (A) ou de césium (B). On détecte dans les deux cas les fragments négatifs.

collision avec le césium possède 33 atomes de ^{12}C et 1 atome de ^{13}C . Ainsi, si la collision conduit à la formation d'un dianion, nous détecterons un pic à $m/q = 562/2 = 281$. À l'inverse, s'il s'agit d'un fragment simplement chargé provenant de la dissociation symétrique de l'anion, alors nous devrions détecter deux pics d'égale intensité. En effet, suite à cette cassure symétrique, le carbone 13 peut se trouver soit dans le fragment neutre (on a alors un pic à $m/q = 280$), soit dans le fragment chargé (on a alors un pic à $m/q = 281$). Le ^{13}C est ainsi utilisé pour permettre une calibration plus précise du spectre. Le résultat de l'expérience est présenté sur la figure 3.25. La comparaison des deux cas de figure montre la présence d'un seul pic décalé d'une seule unité de masse atomique pour l'ion parent $^{13}\text{C}-[PP-H]^-$ (en rouge). Cela semble donc confirmer qu'il s'agit bel et bien d'un dianion et non d'un fragment simplement chargé. Néanmoins, il n'est pas possible de conclure avec certitude, car la largeur à mi-hauteur du pic en pointillés est de 1,5 u.m.a., alors que le cas

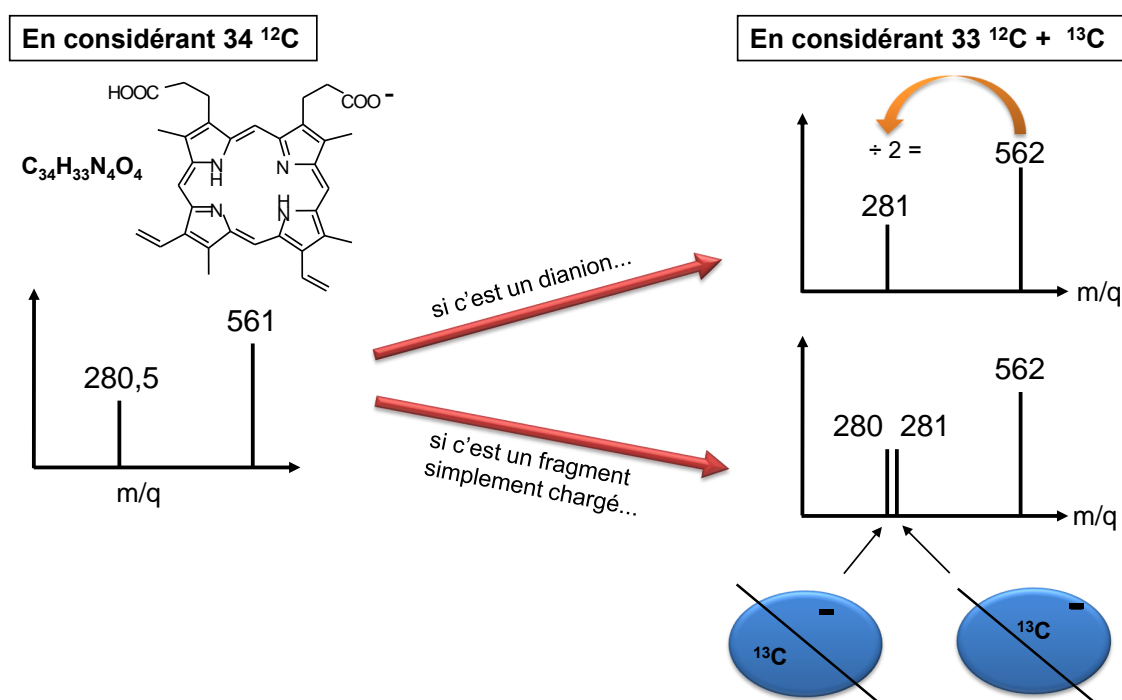


FIGURE 3.24 – Principe de l'expérience cherchant à montrer l'origine des deux nouveaux pics de la figure 3.23-B. L'idée est de sélectionner un faisceau de $[\text{PP-H}]^-$ comportant un atome de ^{13}C et de regarder l'influence sur le spectre.

d'un fragment simplement chargé conduit à la présence de 2 pics séparés d'une seule unité.

En utilisant la même technique que dans l'expérience avec les cations (échange hydrogène / deutérium), il est possible de vérifier si des atomes d'hydrogène sont perdus lors de la formation du dianion $[\text{PP-H}]^{2-}$. Après avoir remplacé le méthanol de la solution de l'espèce $[\text{PP-H}]^-$ par CH_3OD , nous avons sélectionné en masse, avec l'aimant, les anions qui ont échangé un, deux et trois deutériums (le nombre maximum que l'on peut échanger est de trois, 2 pour les groupements NH et 1 pour COOH). Dans chacun de ces trois cas, nous avons enregistré un spectre dans la région du dianion et l'avons comparé à celui obtenu pour l'ion parent non deutéré (voir figure 3.26).

On constate que les quatre pics se trouvent à la même position. Cela signifie que l'analyseur électrostatique laisse passer les dianions à une tension des électrodes égale à la moitié de celle nécessaire au passage de l'ion parent. La perte d'un deutérium lors de la collision impliquerait une transmission du dianion à une tension plus petite, ce qui se traduirait par un décalage ($\Delta(m/q) \neq 0$) du pic sur le spectre de la figure 3.26. La position de référence est attribuée par défaut au dianion provenant de l'espèce $[\text{PP-H}]^-$ non deutérée. Ainsi, la formation de la protoporphyrine doublement chargée lors d'une collision avec des atomes de césium, ne conduit pas à la perte d'hydrogène provenant de NH et COOH (hétéroatomes). Ce résultat est à noter parce qu'il est contraire au comportement connu des anions de nucléotides pour lesquelles la capture d'un électron provoque la perte d'un atome d'hydrogène du groupe NH [73]. Cette conclusion est d'autant plus notable que la perte d'hydrogène implique des dommages conséquents aux systèmes biologiques,

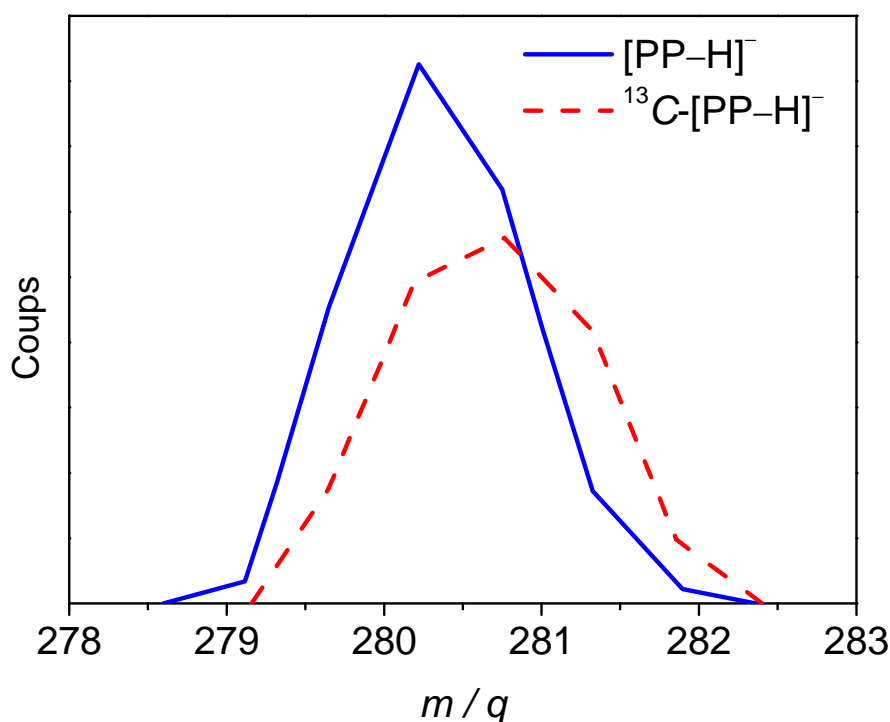


FIGURE 3.25 – Influence de la sélection d'un faisceau d'ions $[PP-H]^-$ (en bleu) ou d'ions $^{13}C-[PP-H]^-$ (en rouge) sur le spectre de la région supposée du dianion.

puisque'il s'agit généralement de fragments secondaires énergétiques qui peuvent être à l'origine de la dissociation d'autres biomolécules (effet indirect).

Enfin, dans le cadre de cette expérience en collaboration avec l'Université d'Aarhus, nous avons pu bénéficier d'un complément théorique à cette étude. Les calculs ont été réalisés à partir du logiciel GAUSSIAN. La géométrie de l'anion $[PP-H]^-$ a été optimisée par une méthode PM3 et le calcul de la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (LUMO) a été réalisé au niveau B3LYP/6-31++G(d).

La figure 3.27-A montre que la LUMO est une orbitale de type π^* qui est localisée sur le macrocycle de la molécule de protoporphyrine IX. On constate que les liaisons entre carbones et hydrogènes ne sont pas antiliantes. La plus haute orbitale occupée dans le cas du dianion $[PP-H]^{2-}$ (appelé SOMO, *single occupied molecular orbital*, dans le cas d'un radical) est visible sur la figure 3.27-B. Elle est très proche de la LUMO de l'anion, ce qui confirme que l'électron supplémentaire provenant du césium possède une forte probabilité de présence sur le macrocycle de la molécule.

Concernant la perte d'hydrogène, nous avons calculé les énergies de plusieurs liaisons C-H et N-H de la protoporphyrine IX. La cassure de la liaison N-H requiert plus de 3,5 eV et celle de C-H plus de 4,3 eV. En conséquence, les résultats sur les énergies de liaison sont en faveur d'une absence de perte d'hydrogène lors de la capture d'un électron par l'anion $[PP-H]^-$, comme nous l'avons observé expérimentalement.

De plus, les fragments $[PP-H-COOH]^{2-}$, visibles sur la figure 3.23, sont très probablement formés par la capture de l'électron du césium au niveau du groupe carboxyle et non

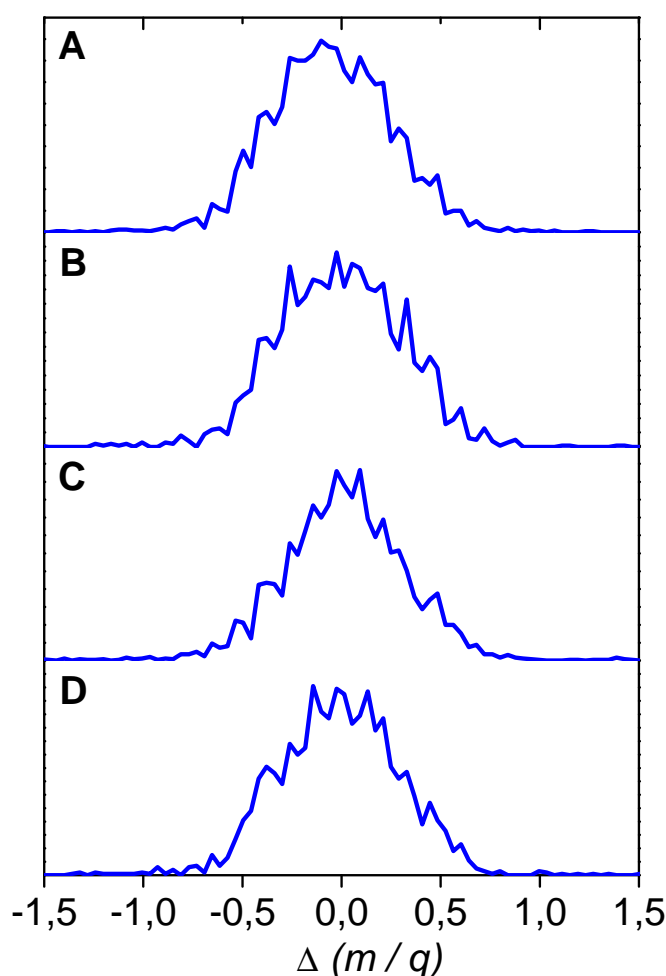


FIGURE 3.26 – Comparaison de la formation du dianion à partir des ions parents $[PP-H]^-$ (A), $[PP-H]^- - D_1$ (B), $[PP-H]^- - D_2$ (C), $[PP-H]^- - D_3$ (D). On s'intéresse précisément à la position du dianion par rapport à celle de l'ion parent de façon à mettre en évidence une éventuelle perte d'hydrogène. La position de référence est donnée par le cas A.

sur le macrocycle. Ceci entraînerait alors la perte du groupement neutre COOH.

Enfin, l'affinité électronique du macrocycle de la molécule de porphyrine neutre a été calculée et est égale à 2,0 eV¹⁰. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature [74]. Par contre, l'affinité électronique du dianion $[PP-H]^{2-}$ est calculée à -0,7 eV. Ainsi, le calcul montre que la probabilité de détachement électronique est importante. Toutefois, comme cette valeur est négative, une forte dépendance vis à vis de la base de calcul est attendue. Bien que le calcul tende à montrer que le dianion est électroniquement instable, ceci expliquerait alors pourquoi l'expérience montre que l'espèce $[PP-H]^{2-}$ possède au moins un temps de vie de quelques μs .

De façon plus générale, la capture électronique sur des ions de protoporphyrine IX, induite par collisions avec des atomes de césium, conduit à un faible taux de fragmentation. On peut finalement noter une différence de comportement entre la molécule chargée positivement et celle chargée négativement. La capture électronique double sur le cation

10. Niveaux de théorie : B3LYP/6-31G++(d,p)//6-31G+(d,p)

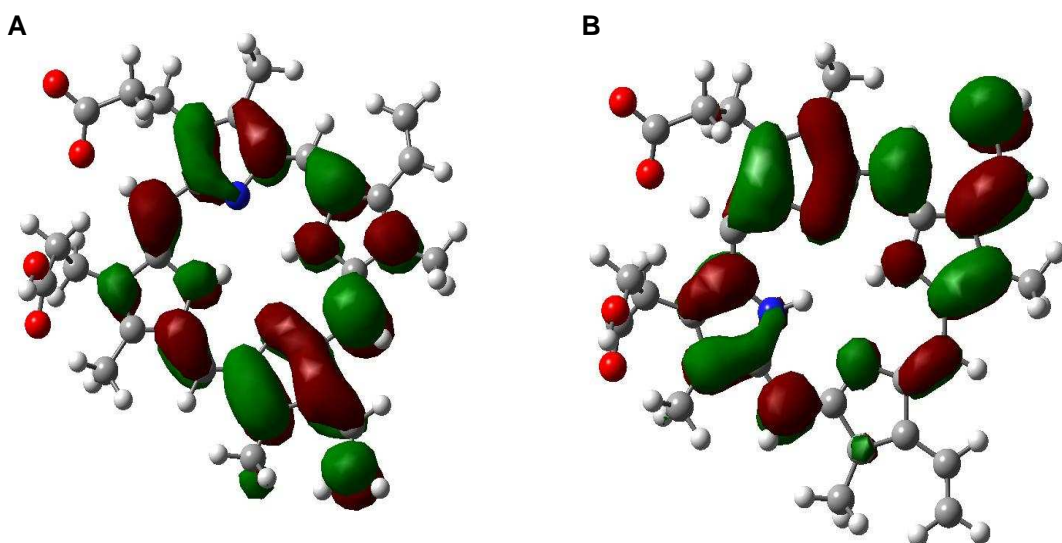


FIGURE 3.27 — Représentation de la plus basse orbitale moléculaire inoccupée (LUMO) de l'anion $[PP-H]^-$ (en A). En B, la SOMO (single occupied molecular orbital) du dianion $[PP-H]^{2-}$, qui correspond à la plus haute orbitale moléculaire occupée dans le cas d'un radical.

$[PP+H]^+$ conduit à une petite proportion d'anions ayant perdu un atome d'hydrogène, alors que cette voie de fragmentation n'est pas observée lors de la simple capture électronique par $[PP-H]^-$. Dans ce dernier cas, les seuls fragments observés proviennent de la perte de COOH.

4 Dépendance de la fragmentation vis-à-vis de l'isomérisation

Sommaire

4.1 Dissociation d' α - et de β -alanine induite par des ions multichargés de basse énergie

Les acides aminés constituent la base des peptides et par extension des protéines, bien qu'ils n'en soient pas les uniques constituants. A cet égard, la molécule de porphyrine de fer, qui n'est pas un acide aminé et dont l'étude a fait l'objet du chapitre 3, représente la partie réactive de la protéine hémoglobine. Parmi les 22 acides aminés présents dans le code génétique animal, la molécule d'alanine, qui est l'objet d'étude de ce chapitre, occupe une place particulière. Il s'agit du seul acide aminé qui existe naturellement sous deux isomères de position différents [75]. En effet, le groupement amine NH_2 et le groupement acide carboxylique COOH sont habituellement fixés sur le même atome de carbone qui est appelé, par convention, carbone α (C_α). Le premier atome de carbone de la chaîne radicalaire est nommé, quant à lui, β (C_β). Dans le cas de l'alanine et afin de préciser l'isomérisation de position de fonction, on parle d' α - et de β -alanine en référence à l'atome de carbone qui porte le groupement amine NH_2 . La figure 4.1 montre explicitement la différence entre les deux isomères. Cette spécificité de la molécule la rend tout à fait intéressante du point de vue des études portant sur la fragmentation de biomolécules. Ce système constitue effectivement un modèle qui permet de préciser dans quelle mesure les voies de dissociation issues de la collision avec des ions multichargés de basse énergie sont dépendantes de la structure initiale de la molécule. Ainsi, des différences observées dans l'ionisation et la dynamique de fragmentation en fonction de l'isomère considéré permettrait de mettre en évidence une certaine spécificité des ions multichargés.

4.1 Dissociation d' α - et de β -alanine induite par des ions multichargés de basse énergie

L'expérience présentée dans ce chapitre est le résultat d'une collaboration avec l'équipe de Thomas Schlathölter du KVI (*Kernfysisch Versneller Instituut*), à l'Université de Groningen (Pays-Bas). Dans le cadre de cette thèse, nous avons eu de nombreux échanges entre Caen et Groningen, afin de préparer, réaliser, analyser et enfin publier les différentes

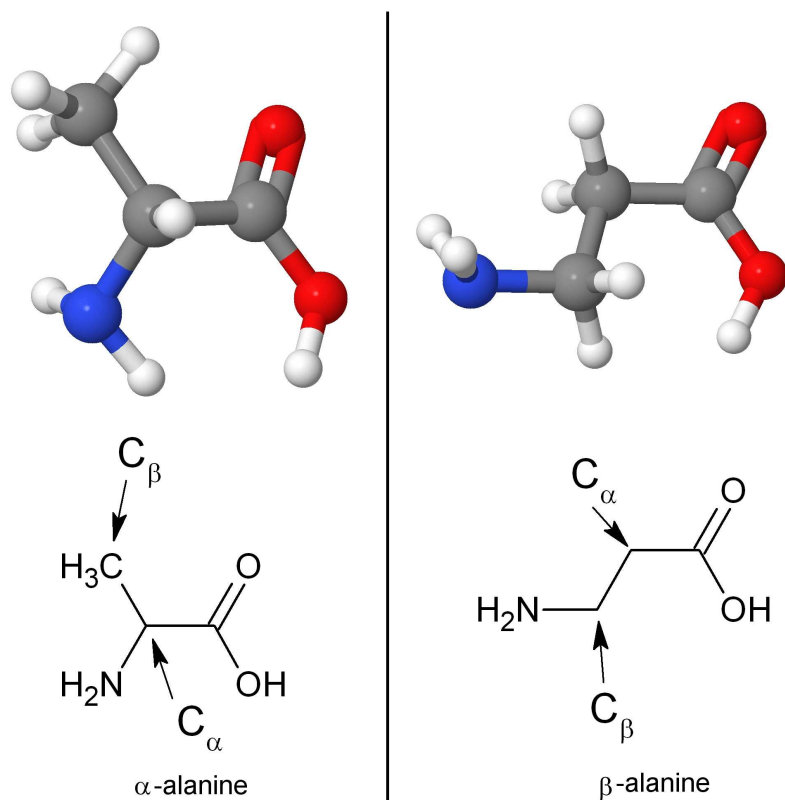


FIGURE 4.1 — Formules semi-développées (en bas) et représentations 3D d'une conformation possible (en haut) de l' α - et de la β -alanine. Il s'agit d'isomères de position de fonction.

II.4

expériences présentées dans ce manuscrit. Ces travaux ont été possibles grâce au support fourni par le réseau européen ITS LEIF dédié aux recherches utilisant des ions de basse énergie.

Ce chapitre est donc l'occasion de décrire le dispositif expérimental que j'ai utilisé au KVI et qui est commun à d'autres expériences évoquées dans cette thèse (voir chapitre 5 sur les nucléobases page 97). Dans les chapitres suivants qui utilisent cet outil, nous détaillons les conditions expérimentales utilisées en y précisant, au besoin, les modifications apportées.

4.1.1 Dispositif expérimental du KVI

Le dispositif expérimental est présenté sur la figure 4.2. Il peut se décomposer en quatre parties. La première permet le contrôle du faisceau d'ions et son guidage jusqu'à la zone de collision. Une fois l'intensité du projectile optimisée, le faisceau peut-être dévié grâce à deux jeux de déviateurs (le premier jeu de plaques est noté Pl_1 et Pl_2) disposés devant le premier diaphragme D_1 . Leur rôle est de permettre la production d'un faisceau pulsé dont l'extension temporelle des paquets d'ions est de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes. Pour réaliser des impulsions aussi courtes, la plaque Pl_1 est maintenue à un potentiel constant de 90 V, pendant qu'une tension crête de plus forte amplitude (250 V) est appliquée sur Pl_2 . Pendant un bref instant (qui peut-être inférieur à 10 ns), lorsque les deux tensions sur les plaques Pl_1 et Pl_2 sont égales, le faisceau d'ions multichargés passe à

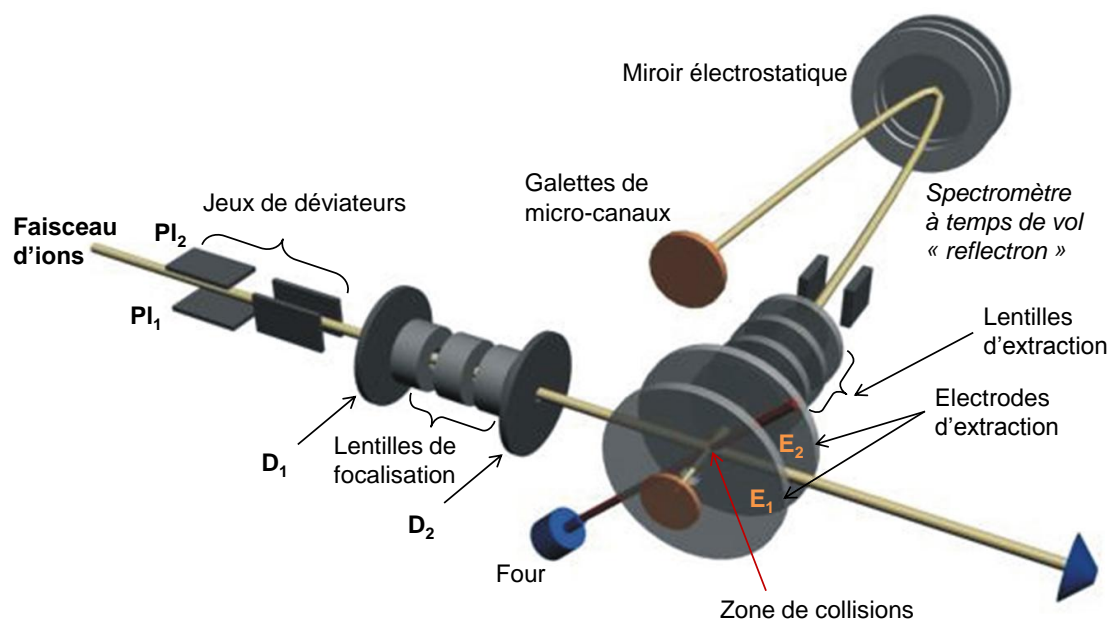


FIGURE 4.2 – Schéma du dispositif expérimental utilisé au KVI.

travers le jeu de déviateurs. Notons que le passage du faisceau n'est rendu possible que sur le front montant du créneau appliqué à PI_2 , afin d'éviter son passage lors du front descendant qui est beaucoup plus lent que le front montant. La figure 4.4 illustre ce principe. Dans cette expérience, la fréquence de pulsation du faisceau était de 10 kHz. Après le diaphragme D_1 de diamètre 1 mm se trouve un ensemble de lentilles de focalisation qui sont utilisées pour effectuer de petites corrections sur les faisceaux. Le paquet d'ions atteint alors le second diaphragme D_2 de 1 mm de diamètre et séparé de 205 mm de D_1 . L'ensemble des deux diaphragmes permet d'obtenir un faisceau bien défini. Les ions projectiles arrivent alors dans la zone de collision, où règne une pression qui est inférieure à 2×10^{-8} mbar.

La production des molécules d'intérêt biologique en phase gazeuse constitue la seconde partie du dispositif expérimental. Les biomolécules sont évaporées grâce à un four chauffé par un fil thermorésistif, dans lequel elles ont été préalablement déposées sous forme de poudre. Pour la molécule d'alanine, le four est maintenu à une température de 420 K. Le nez du four est collimaté par un diaphragme de 500 μm de diamètre et est placé à une distance d'environ 20 mm du centre de collision.

La zone de collision correspond à la troisième partie de l'expérience. Afin de limiter la présence de gaz résiduel dans cette zone, une plaque en inox refroidie à l'azote liquide est installée à proximité de la zone de collision. Elle joue ainsi le rôle de piège cryogénique. La pression dans la chambre de collision est ainsi toujours inférieure à 5×10^{-7} mbar, même en présence d'une vapeur de biomolécules. Après collision, les fragments chargés produits lors de l'interaction sont extraits de la zone de collision à l'aide d'un champ électrique constant. La valeur de ce champ est habituellement comprise entre $600 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $100 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans les expériences où l'on cherche à extraire avec un champ faible. Les résultats de ce chapitre sont obtenus avec un champ d'extraction de $150 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$, qui est produit par une différence de potentiel appliquée entre deux plaques en inox de 60 mm

de diamètre et séparée de 10 mm (voir figure 4.2). Afin d'éviter que ces plaques ne soient recouvertes par un dépôt isolant provenant du faisceau de biomolécules, les disques en inox sont chauffés à une température de 100°C pendant les expériences. Du fait de la présence de ce champ électrique, les produits de la collision chargés positivement vont être extraits vers un diaphragme et un système de lentilles avant d'entrer dans la quatrième partie du dispositif expérimental : le système de détection. Le diaphragme d'extraction a un diamètre de 5 mm et les ions mettent en moyenne quelques nanosecondes pour l'atteindre.

Le système de détection, quant à lui, est composé d'un spectromètre à temps de vol de type « reflectron » [76] et d'un détecteur à galettes de micro-canaux de 50 mm de diamètre.

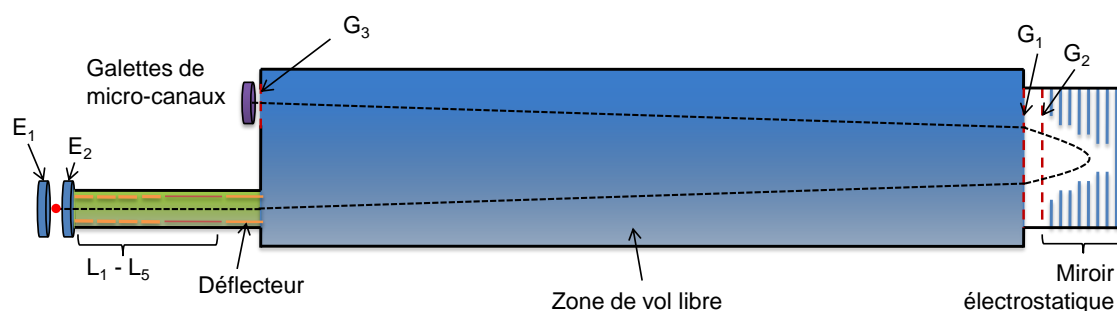


FIGURE 4.3 — Vue schématique du système de détection utilisé à KVI avec le parcours d'un ion dans le spectromètre à temps de vol de type « reflectron ».

La figure 4.3 est une vue schématique de la partie détection utilisée dans cette expérience. Le spectromètre à temps de vol débute par un ensemble d'éléments optiques qui permettent de guider les fragments positifs jusqu'à la zone de temps de vol libre. Pour ce faire, le système est équipé de 4 lentilles d'extraction (L_1 à L_4), puis d'un tube d'extraction (L_5). Une paire de plaques déflectrices est disposée à la fin du dispositif optique afin d'optimiser le transport des produits de la collision dans le spectromètre. Les ions entrent ensuite dans la région de vol libre qui est un tube de 80 cm de longueur. Il se termine par un ensemble de deux grilles (G_1 et G_2) de haute transmission (88%), qui permettent d'assurer une transition homogène entre la région de vol libre et le miroir électrostatique. Le rôle de ce dernier est de compresser et de réfléchir le paquet de fragments en direction du dispositif de détection. Celui-ci est constitué de galettes de micro-canaux devant lesquels une troisième grille (G_3) est installée. L'efficacité de détection est de l'ordre de 55%, mais dépend du rapport m/q considéré. Le spectromètre possède une résolution de $m/\Delta m = 1500$ pour une masse m de 720 u.m.a. [77]. En ne considérant que la transmission des grilles et l'efficacité de détection, l'efficacité totale du spectromètre est d'environ 30%. Il s'agit d'une valeur maximale puisque les pertes liées au système optique ne sont pas prises en compte. Le signal issu des galettes est ensuite amplifié et filtré grâce à une chaîne électronique de traitement du signal (préamplificateur, amplificateur, discriminateur). Le signal traité est envoyé vers une carte, au format PCI, équipée d'un convertisseur temps numérique avec enregistrement « multi-stop » (modèle FAST ComTec P7888, possédant une résolution temporelle de 1 ns) afin d'enregistrer en coïncidence l'ensemble des temps de vol des fragments chargés issus d'une seule et même collision. Ainsi le système d'acquisi-

tion de données offre la possibilité d'enregistrer les temps d'arrivée sur le détecteur de tous les fragments positifs chargés qui proviennent d'un évènement collisionnel. En forme de synthèse du dispositif utilisé, nous précisons sur la figure 4.4 le chronogramme qui permet de contrôler le faisceau d'ions multichargés et la synchronisation du système de détection.

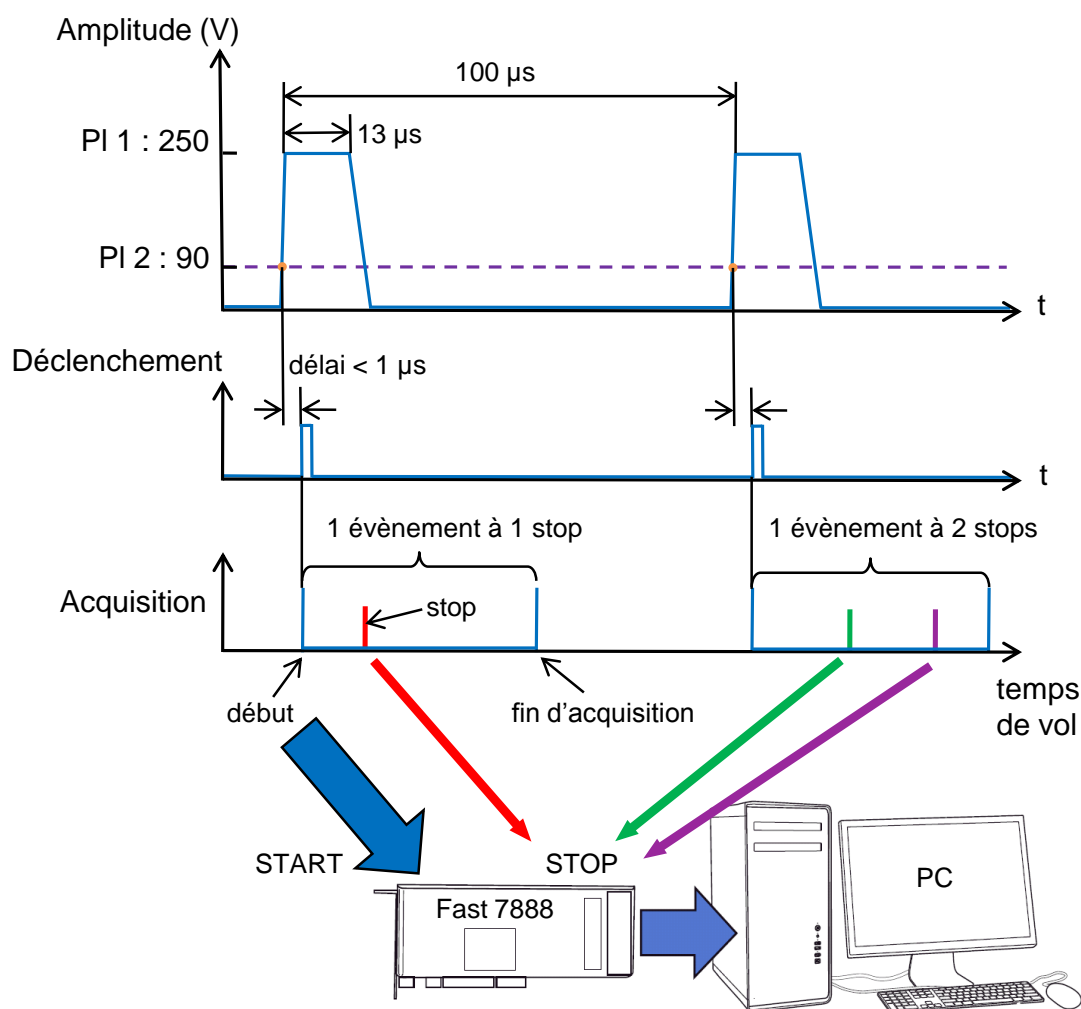


FIGURE 4.4 – Chronogramme de l'expérience.

4.1.2 Analyse des données

L'analyse des données de l'expérience conduit à la réalisation de plusieurs types de spectres. Le spectre de fragmentation constitue la représentation de tous les produits chargés positivement, formés lors des collisions entre le faisceau d'ions multichargés et la molécule biologique cible. Il présente le nombre de coups enregistré en fonction des temps de vol des ions émis lors de simples ou de multiples ionisations (qui peuvent conduire à la fragmentation), sans qu'il soit *a priori* possible de les distinguer, parce que l'on ne mesure que le rapport m/q . Le mode d'enregistrement particulier de l'expérience, dit « multi-stop » et présenté de façon schématisée sur la figure 4.4, permet de retrouver, évènement par évènement, les temps de vol des fragments chargés de la collision (voir méthode

Photoion-Photoion Coincidence [78]. Chaque évènement (c'est-à-dire chaque collision) est enregistré indépendamment avec les temps de vol des fragments positifs associés dans le fichier d'acquisition. Ainsi, il est possible d'isoler différents processus physiques de façon à mieux caractériser le type d'interaction ayant conduit à telle ou telle voie de fragmentation. Pour cela, nous effectuons un traitement numérique du fichier de données afin de regrouper les évènements pour lesquels un seul fragment, deux fragments ou plusieurs fragments ont été détectés après l'impact. L'ensemble des évènements correspondant à la détection d'un seul produit chargé permet alors de tracer un spectre « un-stop », dont l'étude renseigne sur la dissociation induite par l'ionisation simple de la cible¹. De la même façon, la sélection des évènements ayant conduit à l'enregistrement des temps de vol de deux fragments positivement chargés permet de construire le spectre « deux-stop » et un diagramme de corrélations qui rend compte de la double ionisation². Ce type d'analyse n'est possible que si l'on parvient à éviter les corrélations fortuites, c'est-à-dire la possibilité que deux ou plusieurs collisions aient lieu pendant un même pulse d'ions. Pour ne pas rencontrer ce problème, des conditions expérimentales particulières sont mises en œuvre. Le faisceau est pulsé à une fréquence de l'ordre de 10 kHz et l'on s'assure que le taux de comptage pour les évènements à « un-stop » sont de l'ordre de 100 Hz. Dans ces conditions, un évènement n'implique statistiquement qu'une seule collision et la probabilité que deux collisions se produisent est inférieure à 1 %.

A titre d'exemple, la figure 4.5 montre un diagramme de coïncidence complet à deux fragments pour la molécule d' α -alanine après collisions avec des ions He^{2+} de 40 keV. Cette figure est construite après avoir sélectionné les évènements pour lesquels deux stops ont été enregistrés (voir l'exemple de la figure 4.4). Le premier fragment qui arrive sur le détecteur (en vert sur l'exemple de la figure précédente) est tracé sur l'axe des abscisses du diagramme, alors que le second fragment (en violet), qui provient du même processus et qui arrive plus tard, est porté sur l'axe des ordonnées. La formation d'îlots est donc caractéristique des corrélations à deux fragments. Ce diagramme de coïncidence peut ensuite aisément être calibré en rapport masse sur charge m/q , puisque le temps de vol d'ions voyageant sous l'influence de potentiels électrostatiques est proportionnel à la racine carrée du rapport m/q .

Détermination de l'énergie cinétique des fragments

L'un des intérêts majeurs des études en coïncidence est la possibilité de déterminer avec précision l'énergie cinétique des fragments chargés produits lors de la collision. Nous détaillons dans la suite la méthode permettant d'extraire cette information du diagramme de corrélations. En particulier, nous évoquons les contraintes géométriques du dispositif expérimental qui induisent une limitation de la transmission.

On considère, dans un premier temps, le cas de la fragmentation d'une molécule en deux

1. Remarquons que l'explication que nous donnons ici est incomplète, puisque le spectre « un-stop » contient également des espèces multi-ionisées n'ayant pas fragmenté.

2. Même remarque que ci-dessus : il peut aussi s'agir d'espèces multi-ionisées ayant fragmenté en deux cations.

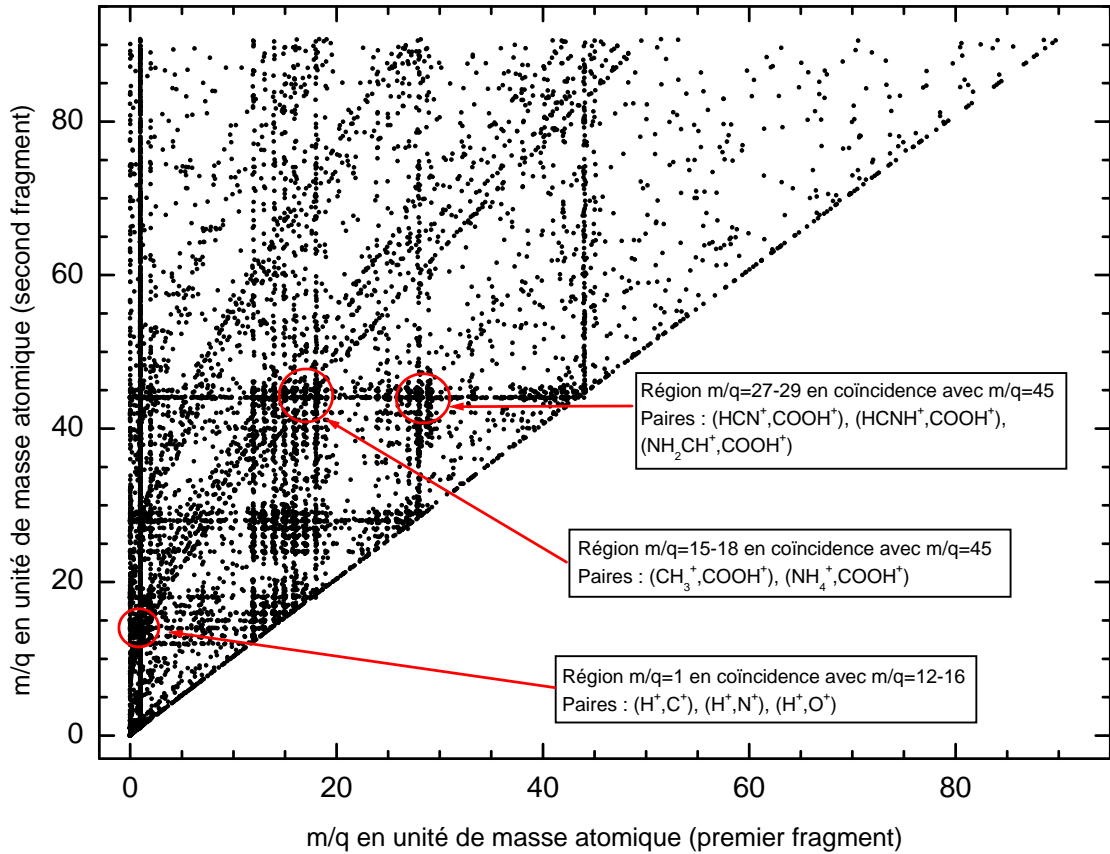


FIGURE 4.5 – Diagramme de corrélations des fragments produits lors de la collision entre l' α -alanine et un faisceau d' He^{2+} à 40 keV (événements à deux stops). Les régions entourées correspondent aux fragments corrélés positifs que nous détaillons dans la suite du chapitre.

espèces positivement chargées comme cela est illustré dans les cas (a) et (b) de la figure 4.6. Nous rappelons de plus que les deux fragments (vert et rouge) sont formés à la même position, puisque les dimensions de la molécule sont négligeables devant l'extension spatiale du système d'extraction (plaques E_1 et E_2 sur le schéma). Du fait de la présence d'un diaphragme dans le dispositif expérimental au niveau de la plaque E_2 , deux cas de figure extrêmes vont se présenter.

En effet, l'émission des deux fragments peut être parallèle (cas (a)) ou perpendiculaire (cas (b)) au champ électrique d'extraction. La première situation va conduire à une transmission égale à 100% alors que la seconde conduira à une transmission nulle puisque les deux espèces chargées vont heurter la plaque d'extraction. Dans le cas général, il faut prendre en compte le fait que l'émission des fragments est isotrope, car la molécule n'est pas orientée. De ce fait, les cations produits lors de la collision sont extraits et donc détectés avec une certaine probabilité. En conséquence, il convient d'apporter une correction en transmission à la distribution en énergie cinétique obtenue. Cette correction est basée sur un modèle dans lequel on considère l'expansion d'une sphère en fonction du rayon du diaphragme, du champ d'extraction, du rapport m/q et de l'énergie cinétique initiale.

La détermination de l'énergie cinétique des fragments est effectuée à partir du dia-

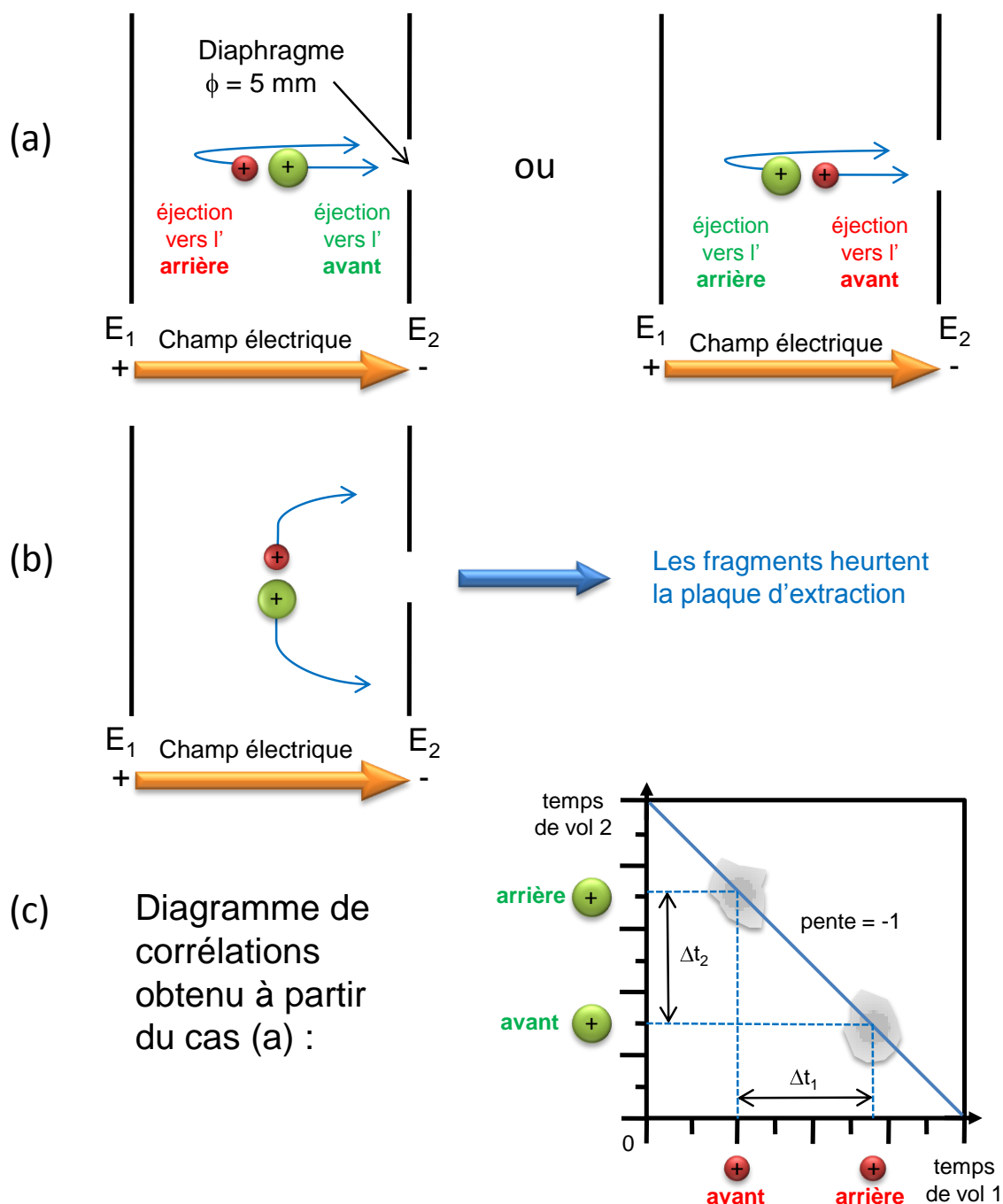


FIGURE 4.6 – Incidence du diaphragme sur la transmission des fragments chargés : (a) lorsque la molécule est orientée le long du champ électrique et (b) lorsque elle est perpendiculaire au champ d'extraction. La partie (c) montre l'incidence de la transmission sur le diagramme de corrélations à partir du cas (a). Le schéma permet également d'obtenir l'énergie cinétique libérée lors de la collision, comme cela est évoqué dans la suite du texte.

gramme de corrélations tel que celui de la figure 4.5. Reprenons de façon plus détaillée le cas (a) du schéma 4.6 dans lequel on se restreint à une émission des fragments parallèle au champ d'extraction. Soit le fragment rouge est émis en direction de la plaque E_1 (illustration de gauche : éjection vers l'arrière), soit il est émis vers le diaphragme de la plaque E_2 (illustration de droite : éjection vers l'avant). Dans les deux cas, la vitesse initiale du

cation rouge ne diffère que par le signe. Cela va conduire à une différence dans les temps de vol de détection de cette particule, suivant que le fragment est émis vers l'avant (en direction du diaphragme) ou vers l'arrière (vers la première plaque d'extraction), comme on peut le voir sur le cas (c) de la figure 4.6. La différence en temps Δt_1 va être utilisée pour calculer l'énergie cinétique libérée (E_{c1}) lors de la dissociation à partir de la relation suivante :

$$E_{c1} = \frac{\epsilon^2 q^2 \Delta t_1^2}{8m}, \quad (4.1)$$

où q est la charge du fragment, m sa masse, ϵ le champ électrique d'extraction. Un raisonnement similaire pour le fragment vert (figure 4.6) permet, de façon identique, de calculer l'énergie cinétique (E_{c2}) de ce cation.

Ainsi, dans un processus de fragmentation à deux corps du type :



le diagramme de corrélations entre les fragments R^+ (pour rouge sur la figure 4.6) et V^+ (pour vert) détectés va permettre de déterminer les énergies cinétiques de chacune des espèces chargées et ainsi de remonter à l'énergie totale libérée lors de la dissociation. La partie (c) de la figure 4.6 représente ainsi de manière schématique une portion d'un diagramme de corrélations dans lequel on voit apparaître deux îlots séparés correspondant aux temps d'arrivée différents des fragments (avant et arrière) sur le détecteur. À partir de la projection des îlots sur les axes « temps de vol 1 » et « temps de vol 2 », on peut calculer les différences en temps $\Delta t_1 = t_{\text{vol1}}(R_{\text{avant}}^+) - t_{\text{vol1}}(R_{\text{arrière}}^+)$ et $\Delta t_2 = t_{\text{vol2}}(V_{\text{avant}}^+) - t_{\text{vol2}}(V_{\text{arrière}}^+)$ des fragments rouge et vert. A cause de la conservation de l'impulsion totale, la pente de la droite reliant les centres des îlots doit être égale à -1. En effet, d'après la relation 4.1, on peut écrire que le rapport des normes des impulsions est égale à :

$$\frac{p_2}{p_1} = \frac{\Delta t_2}{\Delta t_1} = - \text{pente} \quad (4.3)$$

Nous verrons dans la partie suivante 4.1.3 qu'il est possible, grâce à cette pente, d'aller plus loin dans l'analyse, notamment dans le cas où la molécule ne se dissocie pas uniquement en deux fragments.

4.1.3 Résultats expérimentaux

La figure 4.7 montre deux spectres caractéristiques des fragments positivement chargés produits lors de la collision entre un faisceau d' He^{2+} (énergie cinétique de 40 keV) et les deux isomères de l'alanine (α -alanine en haut et β -alanine en bas). La première remarque que nous pouvons faire est que, contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la molécule de porphyrine (voir figure 3.6 du chapitre 3), la molécule intacte d' α -alanine chargée une fois (de rapport $m/q = 89$) n'est pas visible sur le spectre et celle de la β -alanine n'est présente qu'en quantité infime, marquant la faible stabilité de l'édifice vis-

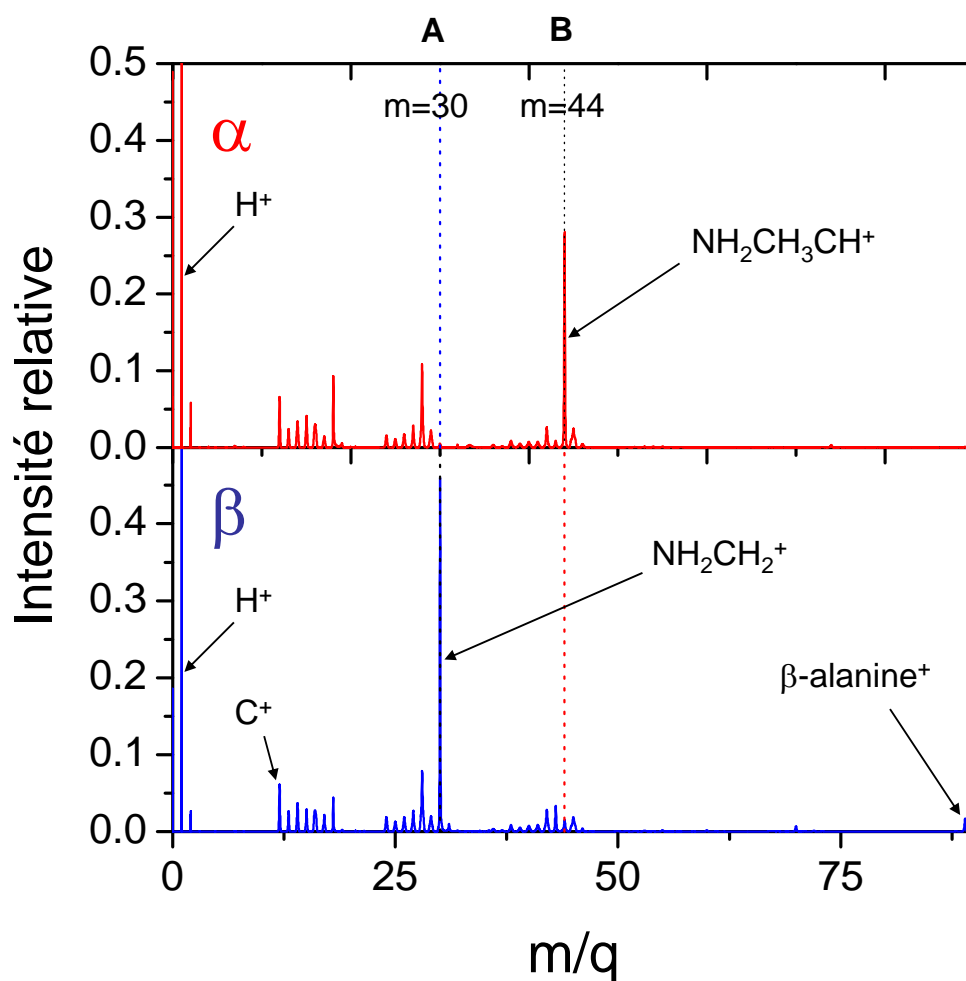


FIGURE 4.7 – Spectre de masse des fragments produits lors de la collision entre l' α - (en haut) ou la β -alanine (en bas) et l'ion He^{2+} à 40 keV.

à-vis de l'irradiation. Ainsi, la probabilité d'ionisation non dissociative de l'alanine est particulièrement faible.

Pour l'isomère α , les fragments positifs dominants sont constitués d' H^+ et de l'espèce $\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+$ à laquelle correspond le rapport $m/q = 44$. Ce fragment provient de la cassure de la liaison $\text{C}-\text{C}_\alpha$. Ce canal de fragmentation est également prévu par la théorie, puisqu'il s'agit du canal de fragmentation le plus favorable énergétiquement [79]. Dans le cas de la β -alanine, le proton H^+ est également le fragment majoritaire, suivi de l'espèce NH_2CH_2^+ de rapport $m/q = 30$. Cette voie de dissociation s'explique par la cassure de la liaison $\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta$. En comparant les spectres de fragmentation des deux isomères, on s'aperçoit que le fragment NH_2CH_2^+ ($m/q = 30$) est quasiment absent dans le cas de l' α -alanine et, à l'inverse, que le cation $\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+$ ($m/q = 44$) n'intervient que de façon tout à fait minoritaire dans la fragmentation de la β -alanine. Ainsi, il existe une voie de fragmentation privilégiée propre à chacun des deux isomères. Des résultats analogues ont été obtenus avec le projectile O^{5+} à une énergie cinétique de 50 keV. Pour les expériences menées avec He^+ , nous avons observé que la production des espèces $\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+$ et NH_2CH_2^+ était

moins importante et nous en donnons une explication dans la suite de ce chapitre. Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus dans des expériences d'ionisation par impact électronique [80] ou de photo-ionisation [81].

Ces résultats et particulièrement leur dépendance en fonction des projectiles peuvent être discutés en terme de spécificité des ions multichargés. En effet, comparé à l'ionisation électronique ou à la photo-ionisation, la simple capture électronique induite par des ions multichargés est un processus très sélectif. La capture est, en effet, restreinte à la plus haute orbitale moléculaire occupée (abrégiée en HOMO pour *Highest Occupied Molecular Orbital*). Dans la gamme d'énergie qui nous intéresse dans le cadre de cette thèse, de l'ordre de quelques dizaines de keV, la simple capture électronique est également le processus qui possède la plus grande section efficace. C'est donc ce processus qui domine le spectre de fragmentation de la figure 4.7. Par ailleurs, la simple capture électronique induite par des ions multichargés de basse énergie est connue pour ne transférer que très peu d'excitation vibrationnelle à la molécule cible [60, 61]. Nous avons également observé le fait que la spécificité de la fragmentation vis à vis de l'isomère considéré est plus faible dans le cas d'un faisceau d'O⁵⁺ qu'avec des ions He²⁺. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'utilisation d'un projectile plus fortement chargé augmente généralement la probabilité de multi-capture électronique. Ainsi l'impact avec des ions O⁵⁺ provoquerait une fragmentation plus importante de la biomolécule à cause de processus de capture multi-électronique plus importants. Nous avons également évoqué le fait que le spectre de fragmentation issu de collisions avec He⁺ ne mettait pas en évidence la dépendance isomérique de façon aussi claire qu'avec les deux autres projectiles (He²⁺ et O⁵⁺). Ce dernier point est lié à l'utilisation d'un ion monochargé. Pour un tel projectile, il a été montré que son impact avec des biomolécules provoque une fragmentation beaucoup plus violente que dans le cas d'ions multichargés, où le transfert d'énergie au système est bien moindre [30, 82].

De façon à préciser la dépendance de la fragmentation vis à vis de l'isomère considéré, nous avons cherché à confronter nos résultats expérimentaux avec un calcul théorique. Dans un premier temps, nous avons calculé la distribution de probabilité de présence de l'électron de l'HOMO (plus haute orbitale occupée) pour la molécule neutre puis pour la molécule simplement chargée. La géométrie de la molécule a été optimisée sur la molécule neutre. Ceci est justifié par le fait que le temps d'interaction entre le projectile et l'acide aminé est de l'ordre de quelques femtosecondes. Nous supposons donc une ionisation verticale de type Franck-Condon. Les résultats³ obtenus sont présentés sur la figure 4.8 et sont conformes à la structure moléculaire de leur conformère de plus basse énergie en phase gazeuse [83, 84]. Pour les deux isomères neutres, la distribution est centrée sur le groupement amine. La densité électronique s'étend jusqu'au groupement COOH dans le cas de l' α -alanine, contrairement à la β -alanine où elle est essentiellement limitée à l'atome de carbone β sur lequel est fixé le groupement amine. La comparaison de l'HOMO de l'alanine neutre avec celle de la molécule positivement chargée peut donner des indications sur les voies

3. Les calculs ont été effectués à partir de la théorie de la fonctionnelle de densité, au niveau B3LYP et utilisant une base 6-311++G(d,p).

de dissociation attendues. En particulier, l'absence de densité électronique sur la liaison C-C $_{\alpha}$ de l' α -alanine⁺, alors qu'elle est importante sur la molécule neutre, suggère qu'il s'agit d'une voie de fragmentation privilégiée. Une observation du même type sur la liaison C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ de la β -alanine conduit à s'attendre à sa rupture préférentielle.

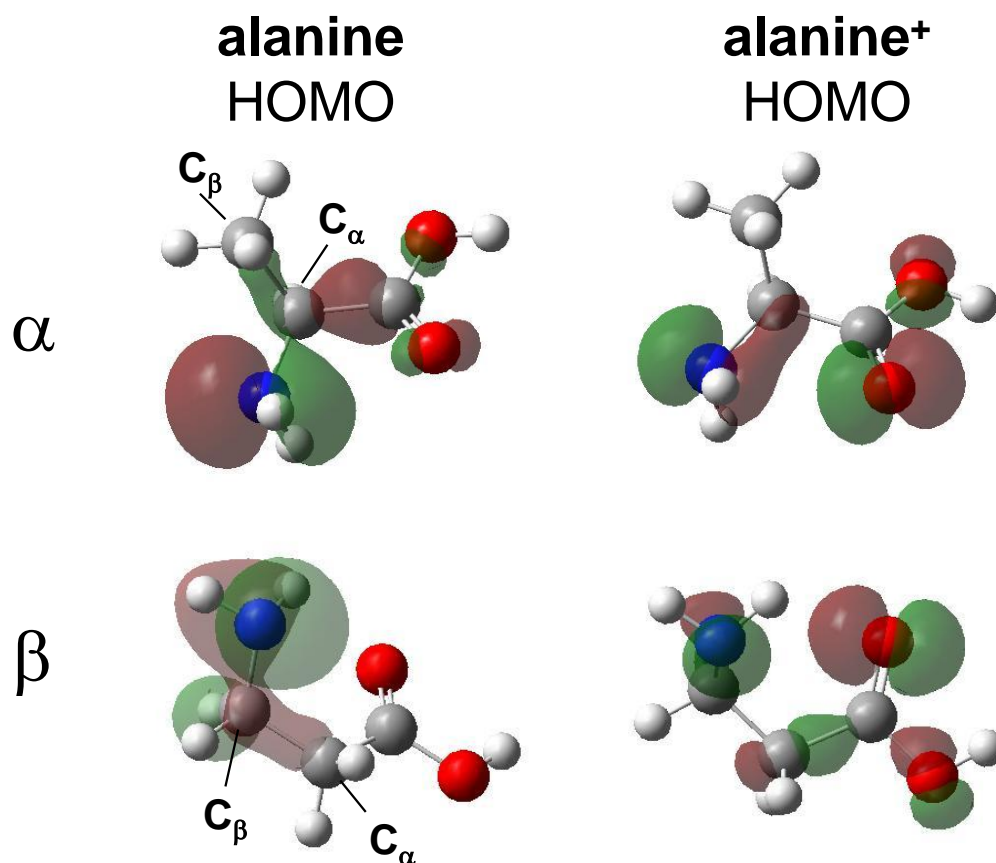


FIGURE 4.8 – Structures moléculaires de l' α - (en haut) et de la β -alanine (en bas) associées à l'HOMO de la molécule neutre (à gauche) et à celle du cation (à droite).

L'hypothèse, qui est cependant faite dans le cadre de cette représentation, est que la fragmentation résulte de la distribution de l'HOMO. Or, ceci n'est pas totalement correct. Le calcul de l'HOMO permet effectivement d'expliquer le processus de détachement électronique, mais pas la fragmentation qui en résulte. Suite à l'interaction avec un ion multichargé, la densité électronique est redistribuée au niveau de la molécule sur une échelle de temps beaucoup plus courte que celle caractéristique de la fragmentation. De fait, l'HOMO n'est pas représentative de la distribution électronique qui conduit au processus de fragmentation. La fragmentation d'un radical cation est généralement déterminée par la position des sites radicalaires. Afin de vérifier les conclusions issues des calculs de l'HOMO, nous avons calculé les densités spatiales de spin de l' α - et de la β -alanine. Par densité spatiale de spin, nous entendons la densité spatiale électronique appliquée aux radicaux libres. De façon plus précise, la densité spatiale de spin est définie comme la différence entre la densité électronique des électrons de spin *up* et celle des électrons de spin *down*. Ainsi, la densité spatiale de spin est la mesure de la probabilité de présence de l'électron non apparié du

radical. La représentation de la distribution spatiale de cette grandeur renseigne, de façon un peu plus précise, sur les voies de dissociation de la molécule les plus probables faisant suite à une capture électronique simple. La distribution de la densité de spin pour les deux isomères est présentée sur la figure 4.9.

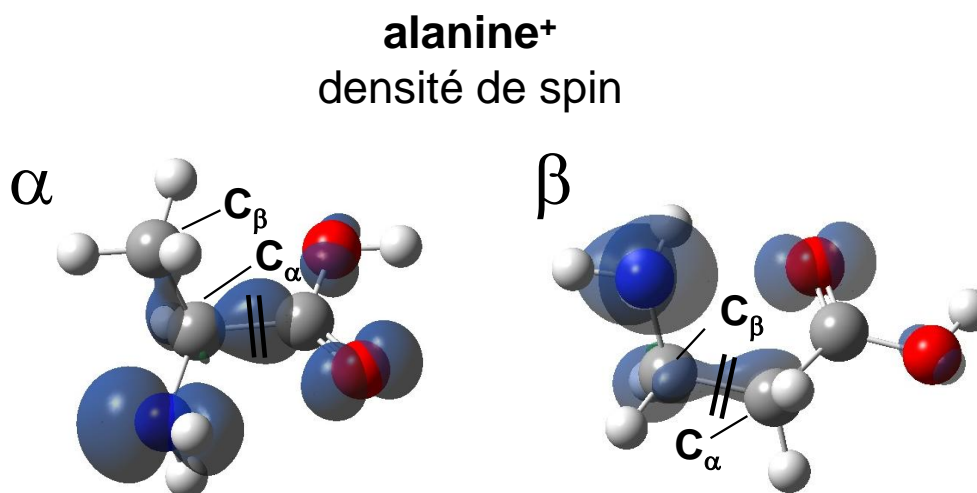


FIGURE 4.9 – Structures moléculaires de l' α - (à gauche) et de la β -alanine (à droite) associées à la densité de spin de l'alanine⁺.

On constate que la distribution de densité de spin pour l' α - et la β -alanine est centrée sur le groupement NH_2 et dans une moindre mesure sur le groupement COOH . Les différences observées entre les deux isomères sont néanmoins plus intéressantes. Dans le cas de l' α -alanine, le groupe amine est lié à l'atome de carbone central C. La figure montre une forte probabilité de présence de l'électron non apparié au niveau de la liaison C- C_α . En conséquence, on peut en déduire que l'ionisation tend à affaiblir cette liaison, ce qui peut conduire à la fragmentation de la molécule par rupture de cette liaison. Pour la β -alanine, c'est la liaison C_α - C_β qui est affaiblie. Ces résultats, issus de calculs théoriques sont en accord avec les voies de fragmentation dominantes obtenues expérimentalement que nous avons discutées précédemment. Il résulte de ces études que la collision de cette molécule avec des ions multichargés de basse énergie conduit à la rupture préférentielle de certaines liaisons chimiques en fonction de l'isomère α ou β .

Formation de l'espèce H_3^+

L'analyse des spectres obtenus met également en évidence la formation de l'espèce H_3^+ . Bien qu'il s'agisse d'une contribution faible, les pics d' H_3^+ apparaissent dans tous les spectres issus des expériences de collisions avec les ions multichargés indépendamment de l'isomère. En particulier l'intensité maximale du pic est obtenue dans les expériences utilisant un projectile d' O^{5+} à 50 keV. L'espèce H_3^+ représente alors 0.1% de l'intensité totale du pic d' H^+ dans le cas de l' α -alanine et 0.07% pour la β -alanine. Les spectres issus de l'interaction avec les autres ions (He^+ et He^{2+}) font apparaître des pics d'intensité deux fois plus faibles pour cette espèce (voir figure 4.10).

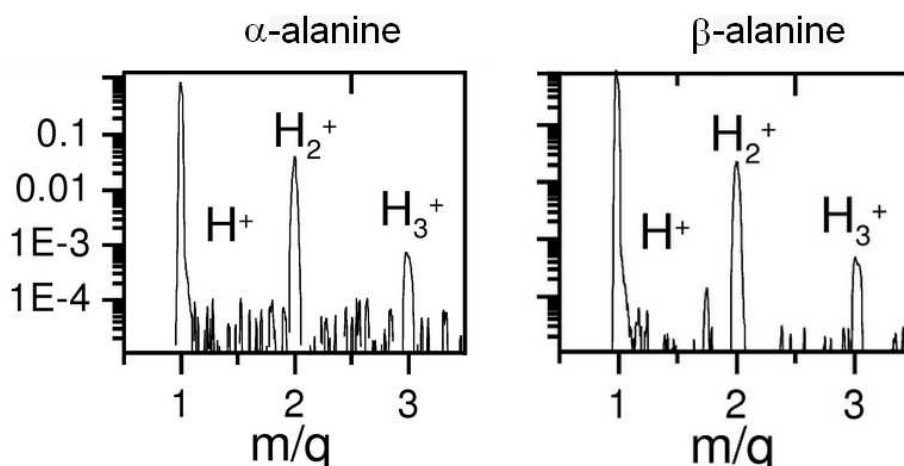


FIGURE 4.10 – Spectre de masse montrant la formation de l'espèce H_3^+ dans le cas de l' α - (à gauche) et de la β -alanine (à droite) lors de collisions avec un faisceau d' He^{2+} à 40 keV.

La formation d' H_3^+ a été observée récemment lors d'expériences de double ionisation du méthanol induite par des ions multichargés [85]. Il a été conclu, par l'équipe de P. Safvan que la formation de cet ion ne pouvait provenir que du groupement méthyl (CH_3). La molécule de β -alanine ne contient pas de groupement CH_3 et cela n'empêche pas la présence d' H_3^+ dans le spectre de fragmentation. Ainsi, l'hypothèse de la migration d'un proton est nécessaire pour expliquer la formation de cette espèce. La molécule d' α -alanine contient, quant à elle, un groupe méthyl dans sa chaîne latérale (voir la figure 4.1 pour rappel). La formation d' H_3^+ n'impliquerait donc pas nécessairement un transfert protonique intramoléculaire. Pour confirmer ceci, il serait par exemple envisageable de reproduire l'expérience avec une molécule d' α -alanine dont la chaîne latérale est complètement deutérée.

Étude de la dynamique de fragmentation à l'aide de la détection en coïncidence

Comme nous l'avons mentionné, le dispositif expérimental utilisé (voir 4.1.1) permet d'enregistrer en coïncidence l'ensemble des espèces positives formées lors d'un même événement. Afin d'obtenir des informations plus détaillées sur la dynamique de dissociation de certains produits de la collision, nous nous sommes intéressés à l'analyse des voies de fragmentation faisant intervenir les cations les plus abondants du spectre de la figure 4.7⁴. Nous détaillons ainsi l'analyse réalisée sur les espèces suivantes : $NH_2CH_3CH^+$ pour l' α -alanine, $NH_2CH_2^+$ pour la β -alanine et H^+ pour les deux isomères. En particulier, nous nous intéressons aux corrélations entre deux fragments positifs, ce qui implique que les événements considérés dans la suite font intervenir des molécules d'alanine essentiellement doublement ionisées après la collision avec un ion multichargé.

L'observation des diagrammes de corrélations pour les deux isomères montre que les corrélations liées à l'émission d'un proton sont largement majoritaires. Ceci est d'autant plus important que les protons sont les fragments secondaires les plus énergétiques issus

4. Les coïncidences ne peuvent être analysées que pour l'ion He^{2+} à cause de considérations statistiques.

de la collision de biomolécules avec des ions multichargés de basse énergie ; donc parmi les plus dangereux du point de vue de l'endommagement par effet indirect [30].

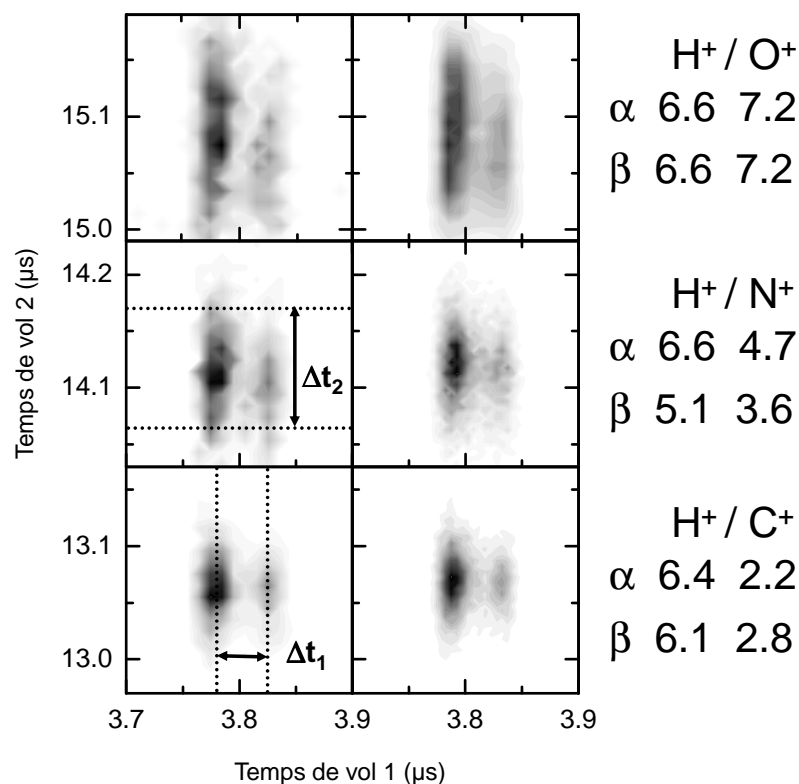


FIGURE 4.11 – Diagrammes de corrélations entre les fragments H^+ / C^+ , H^+ / N^+ et H^+ / O^+ issus de la collision d'ions He^{2+} à 40 keV avec l' α - (à gauche) ou la β -alanine (à droite). Les énergies cinétiques en eV de chaque fragment sont notifiées à droite.

La figure 4.11 correspond au diagramme de corrélations entre H^+ (sur l'axe des abscisses nommé « Tems de vol 1 ») et les cations C^+ , N^+ , O^+ (sur l'axe des ordonnées nommé « Tems de vol 2 »). Ces fragments sont formés suite à l'interaction entre l' α - ou la β -alanine et des ions He^{2+} à 40 keV ayant conduit à une ionisation multiple de la molécule. La structure sous forme de deux îlots provient de la transmission du système d'extraction du dispositif expérimental et plus précisément de la présence d'un diaphragme, comme nous l'avons expliqué en détail au paragraphe 4.1.2. Cette structure en double îlot va nous permettre de déterminer l'énergie cinétique de chacun des fragments. La séparation notée Δt_1 sur la figure 4.11 correspond à la différence de temps de vol entre l'espèce H^+ émise vers l'avant et celle éjectée vers l'arrière. De façon à remonter à l'énergie cinétique du second fragment, nous utilisons la grandeur Δt_2 . Pour que les valeurs obtenues soient comparables d'un diagramme à l'autre, nous avons défini Δt_2 comme le temps nécessaire pour que l'intensité maximale de l'îlot ait chuté de 10%. Connaissant le champ électrique d'extraction, l'état de charge du fragment et sa masse, on calcule l'énergie cinétique par la formule 4.1. Elles sont données en eV sur la partie droite de la figure 4.11. La comparaison des données obtenues montre que les énergies mises en jeu dépendent fortement de l'espèce considérée. Les énergies cinétiques les plus grandes sont attribuées à O^+ et à H^+ , alors

que les plus petites concernent C^+ . Ces résultats ne dépendent que très peu de l'isomère de l'alanine choisie. Dans le cas des expériences utilisant de l' O^{5+} comme projectile, les énergies mises en jeu sont bien plus importantes (15 eV pour H^+ et environ 17 eV pour O^+) puisque la fragmentation peut provenir de molécules d'alanine plus fortement chargées.

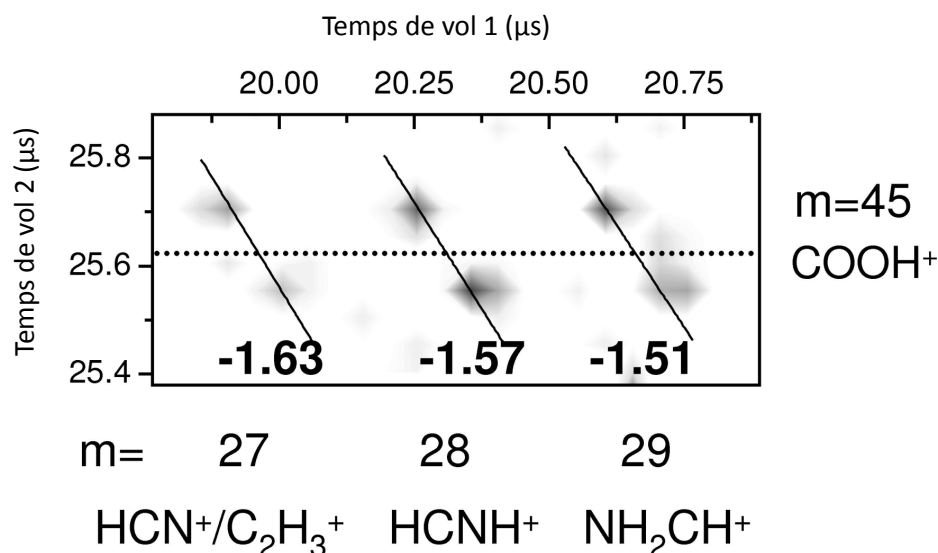


FIGURE 4.12 – Diagramme de corrélations entre les fragments NH_2CH^+ , $HCNH^+$, HCN^+ et le cation $COOH^+$ issus de la collision d'ions He^{2+} à 40 keV avec l' α -alanine. Seule la région $m/q = 27 - 29$ en coïncidence avec $COOH^+$ est visible.

II.4

Pour la perte de $NH_2CH_3CH^+$, formée par la rupture de la liaison C- C_α lors d'une double ionisation, l'isomère α apparaît moins prépondérant que dans le cas de la simple ionisation. Il semble donc que la perte de deux électrons par la molécule altère ce fragment et conduise à une dissociation plus importante de la molécule d' α -alanine. Le fragment $COOH$ de rapport masse sur charge $m/q = 45$ est, par contre, fortement présent sur les diagrammes de corrélations, ce qui n'était pas le cas sur le spectre intégral de fragmentation de la figure 4.7. L'ion $COOH^+$ est observé en coïncidence avec les cations NH_2CH^+ ($m/q = 29$) et $HCNH^+$ ($m/q = 28$) et dans une moindre mesure avec HCN^+ ($m/q = 27$). L'assignation de ce dernier fragment n'est pas évidente puisqu'il peut également s'agir de $C_2H_3^+$ de même rapport m/q (voir Jochims et coll. [ISI :000189216600031]). Néanmoins la perte régulière d'hydrogène entre les trois cations précédents nous a conduits à préférer la première possibilité.

Enfin, la figure 4.13 montre un second groupe d'îlots indiquant les coïncidences observées entre $COOH^+$ et CH_3^+ ($m/q = 15$) d'une part et avec l'ion NH_4^+ ($m/q = 14$) d'autre part.

Comme nous l'avons dit dans la présentation du dispositif expérimental, la pente de la droite joignant le centre des îlots des diagrammes de corrélations à deux corps contient l'information sur la quantité de mouvement des ions fragments. En effet, si les deux fragments positifs détectés correspondent à la dissociation de la molécule en deux corps, la conservation du moment implique une pente de cette droite égale à -1. Si la pente déterminée à partir des données expérimentales est différente, cela signifie que l'hypothèse d'une

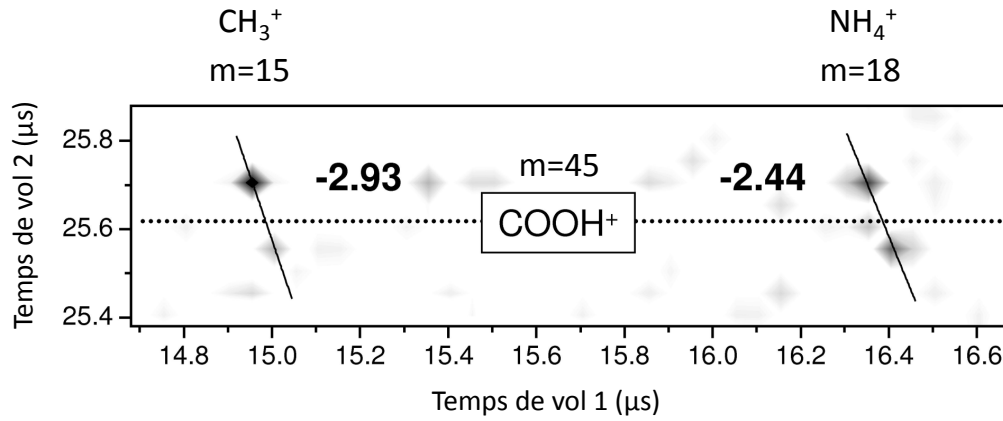


FIGURE 4.13 – Diagramme de corrélations entre les fragments CH_3^+ , NH_4^+ et le cation $COOH^+$ issus de la collision d'ions He^{2+} à 40 keV avec l' α -alanine. Seule la région $m/q = 15 - 18$ en coïncidence avec $COOH^+$ est visible.

fragmentation en deux corps est fautive et on peut alors invoquer un processus à trois corps (ou plus) en plusieurs étapes [86]. Dans la suite, nous utilisons le calcul des pentes de ces droites afin de préciser la dynamique de fragmentation qui résulte des collisions entre des ions He^{2+} à 40 keV d'énergie cinétique et les deux isomères d'alanine.

La figure 4.12, sur laquelle les pentes sont indiquées en gras, illustre le cas d'une fragmentation faisant intervenir un mécanisme à trois corps et en deux étapes pour la molécule d' α -alanine. Nous proposons d'abord un schéma de fragmentation puis nous détaillons l'analyse ayant permis d'y aboutir.

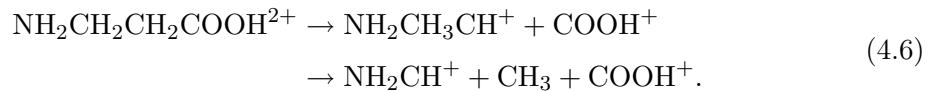
Dans une première étape, il se produit une cassure de la liaison $C-C_\alpha$:



Dans un second temps, l'ion $NH_2CH_3CH^+$ fragmente le long de la liaison $C_\alpha-C_\beta$ en une espèce chargée (NH_2CH^+) et une espèce neutre (CH_3) :



D'où le schéma complet suivant :



Nous justifions maintenant le choix de ce schéma réactionnel. Dans la dernière étape de ce processus (équation 4.5), nous supposons qu'il n'y a pas de perte d'énergie cinétique. En conséquence, le cation NH_2CH^+ est éjecté avec la même vitesse que celle du fragment $NH_2CH_3CH^+$ et la pente de l'îlot doit être égale à $-m(NH_2CH_3CH^+)/m(NH_2CH^+) = -44/29 = -1,51$. Remarquons que cette pente correspond exactement à celle que nous avons déterminée sur la figure 4.12 pour les îlots correspondant aux corrélations entre $COOH^+$ et NH_2CH^+ . Un raisonnement mathématique simple permet de bien expliquer ce

lien.

Soient $p(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)$, $p(\text{COOH}^+)$ et $p(\text{NH}_2\text{CH}^+)$ les normes des impulsions respectives des cations $\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+$, COOH^+ et NH_2CH^+ . Dans le cadre de la réaction 4.4 et en utilisant la relation 4.3, on peut écrire :

$$-\frac{p(\text{COOH}^+)}{p(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)} = -1, \quad (4.7)$$

en considérant l'équation 4.5, on a :

$$-\frac{p(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)}{p(\text{NH}_2\text{CH}^+)} = \text{constante avec constante} < 0, \quad (4.8)$$

dans le cas où l'on suppose que les deux cations sont émis avec la même vitesse, alors :

$$\text{constante} = -\frac{m(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)}{m(\text{NH}_2\text{CH}^+)} = -\frac{44}{29} = -1,51, \quad (4.9)$$

dans le cas général, on peut écrire :

$$-p(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+) = p(\text{NH}_2\text{CH}^+) \times \text{constante}, \quad (4.10)$$

d'où :

$$-\frac{p(\text{COOH}^+)}{p(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)} = -1 = \frac{p(\text{COOH}^+)}{p(\text{NH}_2\text{CH}^+) \times \text{constante}}, \quad (4.11)$$

et finalement :

$$-\frac{p(\text{COOH}^+)}{p(\text{NH}_2\text{CH}^+)} = \text{constante}. \quad (4.12)$$

Ceci démontre que la valeur de la pente déterminée sur la figure 4.12 pour le couple COOH^+ et NH_2CH^+ doit correspondre au rapport des impulsions des espèces chargées de l'équation 4.5. Comme nous avons considéré que la vitesse était la même pour ces deux espèces, alors c'est directement le rapport des masses qui permet de calculer la pente attendue. Nous constatons donc un très bon accord entre la valeur attendue et celle obtenue expérimentalement sur le diagramme de corrélations. L'existence des deux autres paires de cette partie du diagramme de corrélations, à savoir : $\text{COOH}^+(m = 44)/\text{HCNH}^+(m = 28)$ et $\text{COOH}^+(m = 44)/\text{HCN}^+(m = 27)$ s'explique par la perte d'un ou de deux hydrogènes dans un schéma réactionnel similaire à celui de l'équation 4.5. Les pentes de ces couples devant être respectivement égales à $-m(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)/m(\text{HCNH}^+) = -44/28 = -1,57$ et $-m(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)/m(\text{HCN}^+) = -44/27 = -1,63$.

Il est également possible que la charge reste sur le fragment CH_3 . Dans ce cas, c'est le couple $\text{COOH}^+(m = 44)/\text{CH}_3^+(m = 15)$ qui est détecté en coïncidence. La pente attendue pour ce couple est alors $-m(\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+)/m(\text{CH}_3^+) = -44/15 = -2,93$. Nous retrouvons bel et bien cette valeur sur la figure 4.13. Enfin le dernier couple visible sur cette figure fait intervenir COOH^+ et NH_4^+ (pente de $-2,44$). La formation de ce cation fait nécessairement

appel à un réarrangement du cation $\text{NH}_2\text{CH}_3\text{CH}^+$.

Nous avons procédé de façon similaire avec la β -alanine. La figure 4.14 correspond à

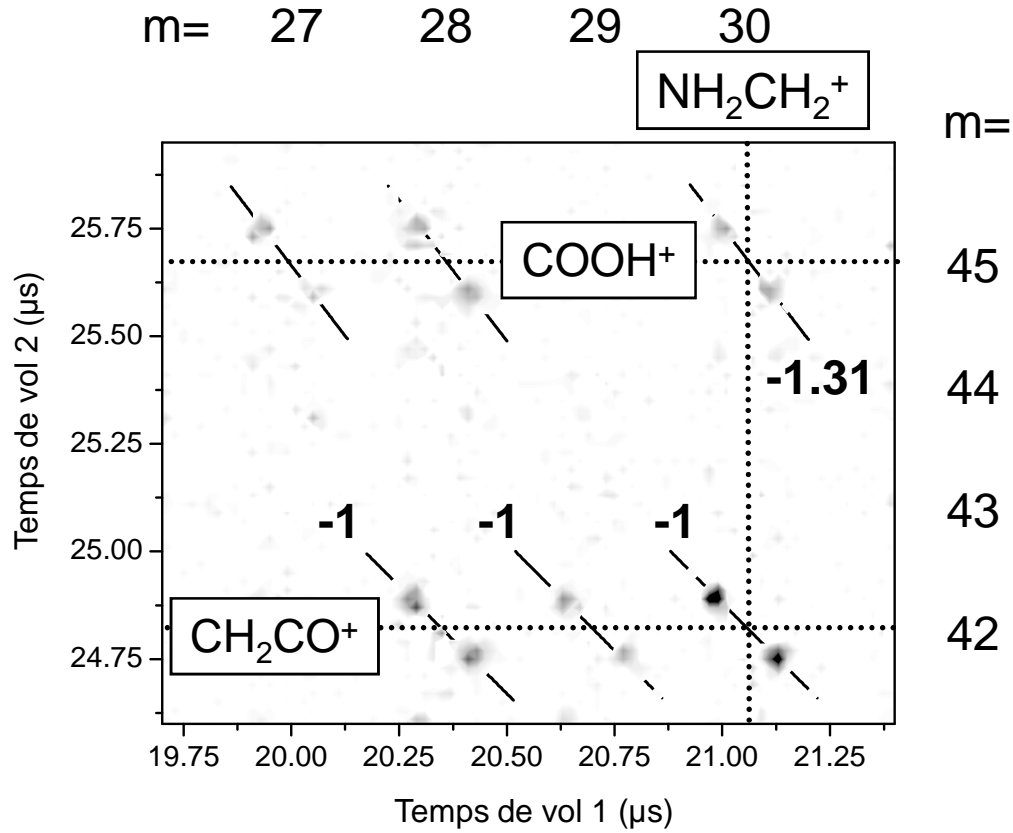
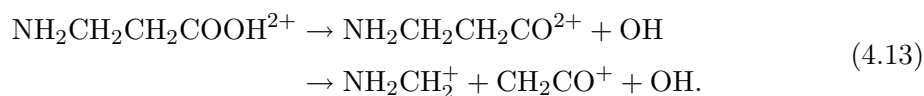


FIGURE 4.14 – Portion du diagramme de corrélations montrant les coïncidences entre NH_2CH_2^+ (ou $\text{NH}_2\text{CH}_2^+(-\text{H}_n)$) et les cations COOH^+ , CH_2CO^+ . Ces fragments proviennent de la cassure des liaisons $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ et C-O suite à la collision d'ions He^{2+} à 40 keV avec la β -alanine.

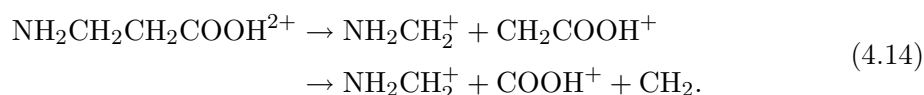
une partie du diagramme de corrélations pour les fragments les plus importants provenant de la collision de la molécule de β -alanine avec des ions He^{2+} à 40 keV. Les coïncidences les plus fortes sont obtenues entre NH_2CH_2^+ ($m/q = 30$) et CH_2CO^+ ($m/q = 42$). De même que pour l' α -alanine, la perte d'un ou de deux atomes d'hydrogène conduit aux espèces NH_2CH^+ ($m = 29$) et HCNH^+ ($m = 28$) que l'on détecte également avec le cation CH_2CO^+ . Les pentes calculées pour les trois couples (28,42), (29,42) et (30,42) sont égales à -1, comme le montre la figure 4.14. Néanmoins, la formation de ces espèces ne peut pas provenir simplement d'un processus de fragmentation à deux corps. En effet, la masse de la β -alanine intacte est égale à 89 unités de masse atomique. En calculant la somme des masses des fragments de chacun des trois couples précédents, on obtient 72 u.m.a. (nous avons pris en compte la perte d'un ou de deux hydrogènes pour les deux derniers couples). Comme la cassure en deux corps n'est pas possible, mais que l'on obtient bien une pente de -1, cela signifie qu'un fragment neutre est préalablement perdu et qu'il n'emporte pas d'énergie avec lui. S'en suit la fragmentation d'un dication de rapport $m/q = 72$ u.m.a. ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{2+}$) en deux corps chargés positivement qui correspondent aux fragments évoqués dans les trois couples ci-dessus. Le mécanisme de dissociation de la β -alanine

s'explique donc de la façon suivante :



L'énergie cinétique totale libérée dans la deuxième étape de cette dynamique de fragmentation peut être obtenue à partir du $\Delta t = \Delta t_1 + \Delta t_2$ de l'îlot du couple (30,42). Nous obtenons alors un KER (*Kinetic Energy Release*) de $(3,5 \pm 0,2)$ eV.

Un autre groupe d'îlots est présent sur la figure 4.14. Il s'agit des corrélations qui font intervenir le cation COOH^+ ($m/q = 45$) avec l'espèce NH_2CH_2^+ ($m/q = 30$), qui peut avoir perdu deux ou trois atomes d'hydrogènes. Les trois îlots visibles proviennent donc des couples $\text{COOH}^+/\text{NH}_2\text{CH}_2^+$, $\text{COOH}^+/\text{HCNH}^+$, $\text{COOH}^+/\text{HCN}^+$. A nouveau l'indication de la pente calculée est présente en gras sur la figure 4.14 et, étant égale à -1,31, indique un mécanisme de fragmentation à trois corps et en deux étapes. On a alors :



On peut vérifier que le schéma réactionnel proposé est cohérent avec les valeurs des pentes obtenues par l'expérience. En faisant l'hypothèse qu'il n'y a pas de perte d'énergie cinétique lors de la dissociation 4.15 et donc que le cation COOH^+ part avec la même vitesse que CH_2COOH^+ ,



alors la pente attendue doit valoir $-m(\text{CH}_2\text{COOH})/m(\text{COOH}) = -59/45 = -1,31$. Ce qui est en très bon accord avec le résultat de la figure 4.14. La détermination de l'énergie cinétique libérée dans la deuxième étape du processus 4.14 montre que celle-ci atteint $(2,2 \pm 0,2)$ eV. Cette valeur est plus petite que celle établie dans le cas de la deuxième étape du processus 4.13 $[(3,5 \pm 0,2)$ eV]. Ceci peut s'expliquer par le fait que la séparation de charge intervient à la première étape du processus 4.14. *A contrario*, dans le processus 4.13, la perte du fragment neutre OH laisse les deux charges sur une seule et même espèce ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^{2+}$). L'énergie cinétique libérée est alors plus importante dans ce processus à cause de la répulsion coulombienne plus forte.

La dynamique de fragmentation qui fait suite à la double ionisation de la molécule d'alanine peut être interprétée en analysant la distribution spatiale de la différence de densité électronique entre le cation et le dication (voir figure 4.15). Ainsi, connaissant la densité de probabilité de présence électronique du cation et lui ayant soustrait celle du dication, on obtient une représentation des zones de plus forte probabilité de perte d'un second électron. Nous avons marqué en noir, sur cette figure, les liaisons qui se dissocient après simple ionisation. Les voies de fragmentation expérimentales qui proviennent de la double ionisation sont représentées en rouge.

Pour l' α -alanine, le processus de fragmentation principal après simple ionisation est la cassure de la liaison C-C $_{\alpha}$ qui conduit à un fragment neutre : COOH. C'est aussi la voie

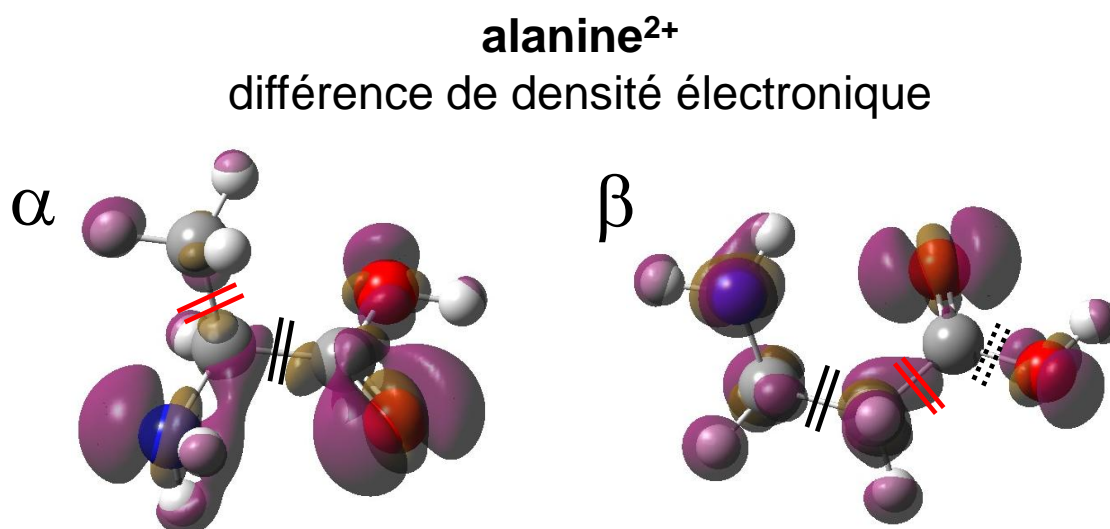


FIGURE 4.15 — Structures moléculaires de l' α - (à gauche) et de la β -alanine (à droite) associées à la différence de densité électronique du dication alanine²⁺.

principale de dissociation dans le cas de la double ionisation, à ceci prêt que le fragment COOH est alors chargé une fois positivement. Ce résultat est attendu à la vue de la figure 4.15, puisque la probabilité de perdre un second électron sur ce groupe est particulièrement importante. Le groupement COOH part donc sous la forme cationique. Le groupement CH₃ semble peu affecté par la double ionisation et la perte du deuxième électron. Comme cela a été mis en évidence dans l'analyse des diagrammes de corrélations, cette espèce peut partir soit sous forme neutre, soit sous forme chargée.

En ce qui concerne la β -alanine, la formation du cation COOH⁺ est également une voie de fragmentation importante pour la double ionisation. La carte de différence de densité électronique montre que la liaison C-C _{α} est particulièrement affectée par la perte du deuxième électron. La production du fragment COOH⁺ fait donc suite à la cassure de cette liaison. Une spécificité de l'isomère β est la perte du fragment neutre OH, qui est plus importante que celle de COOH⁺. Elle correspond au mécanisme 4.13 discuté précédemment où la rupture de la liaison C-O (indiquée par un double trait en pointillé sur la figure 4.15) est suivie par celle de la liaison C _{α} -C _{β} . On peut penser que ce processus est facilité par l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le groupement NH₂ et le deuxième atome d'oxygène de la molécule.

Synthèse

Dans cette partie consacrée aux systèmes biomoléculaires non perturbés par un environnement, nous avons pu étudier les mécanismes primaires, qui conduisent à la fragmentation des molécules. La dissociation peut être induite par des collisions avec des ions multichargés de basse énergie, ou dans un gaz d'atomes alcalins.

En ce qui concerne les résultats, nous avons montré que l'ionisation de la molécule de FeTPPCL par des ions multichargés est bien moins violente que celle issue de collisions avec des électrons à 70 eV. Ainsi, les spectres obtenus rendent compte du fait que la molécule simplement chargée est dominante, tandis que pour les électrons, moins de 1 % de la molécule reste intacte. Nous avons également montré que la perte de l'atome de chlore attaché à celui de fer central représente le canal de dissociation principal et que cette fragmentation peut être retardée et intervenir sur des échelles de temps de quelques microsecondes. De façon tout à fait surprenante, l'émission, à partir de la forme cationique de la molécule, de charges négatives sous forme d'électrons voire probablement sous forme d'anions Cl^- a pu être mise en évidence. Ce processus inattendu, parce qu'il augmente l'état de charge positif de la biomolécule, tend à montrer que les ions multichargés de basse énergie permettent d'ouvrir des voies de fragmentation inédites. Néanmoins, des expériences complémentaires menées en collaboration avec l'équipe de S. Martin, à Lyon, n'ont pas encore permis de confirmer clairement ce phénomène. Par ailleurs, l'observation de fragments atomiques dans des états de charge très différents (C^{2+} et Cl^{5+} , par exemple) indique des différences profondes de mobilité de charges au sein de la molécule.

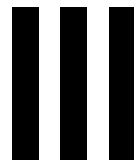
La fragmentation d'une seconde molécule de porphyrine (la protoporphyrine), sous forme cationique et anionique, induite par collisions dans des atomes alcalins (césium) a également été étudiée. Pour les cations, qui capturent deux électrons lors de deux collisions successives et qui sont ainsi convertis en anions, la dissociation est très limitée et seulement un huitième des ions perdent un hydrogène. Dans le cas de la production initiale de molécules négativement chargées, la capture d'un électron supplémentaire conduit à la formation d'un dianion. Le seul canal de fragmentation observé est la perte de CO_2H . Ainsi, les ions de protoporphyrine s'accommodent aisément d'un ou de deux électrons supplémentaires dans l'orbitale moléculaire inoccupée la plus basse (LUMO) du macrocycle de la molécule.

Ces résultats confirment la très grande stabilité des molécules de porphyrine face à une excitation électronique intense (arrachement d'électrons, dans le cas des ions multichargés, ou attachement d'électrons, dans le cas des collisions avec le césium).

Par ailleurs, le travail réalisé sur l'interaction d'ions multichargés avec les molécules iso-

lées d' α - et de β -alanines a permis de démontrer une forte dépendance de la fragmentation vis à vis de l'isomérisation de ces deux biomolécules modèles, se traduisant par une modification notable des rapports de branchements entre les différents fragments. Les spectres de fragmentation laissent également apparaître la formation de l'espèce H_3^+ , dont la présence ne peut s'expliquer que par un réarrangement de la molécule. Enfin, l'énergie cinétique des espèces formées par l'excitation et l'ionisation de la cible biomoléculaire est relativement importante et peut excéder 6 eV (avec des ions He^{2+}) et même 15 eV (avec O^{5+}), ce qui implique que de tels fragments, dans un milieu cellulaire, pourraient potentiellement induire des dommages aux molécules d'ADN présentes dans l'environnement.

Ceci étant, la pertinence de l'extrapolation des résultats issus de systèmes isolés, à la compréhension des effets de l'irradiation du milieu cellulaire peut légitimement être remise en cause. En effet, les dynamiques d'ionisation et de fragmentation en phase gazeuse sont loin d'être identiques à celles liées à la présence d'un environnement biologique. La prise en compte d'environnements modèles est l'objet de la troisième partie de cette thèse.



**Expériences réalisées avec prise
en compte d'un environnement
biochimique**

5 Agrégats de molécules d'intérêt biologique

Sommaire

- 5.1 Agrégats purs de nucléobases
- 5.2 Agrégats mixtes de nucléobases

L'un des intérêts majeurs des travaux sur les biomolécules isolées en phase gazeuse tient en ce qu'il est possible d'étudier les propriétés intrinsèques de ces molécules sans les effets perturbateurs d'un milieu environnant. Dans la partie précédente, les collisions avec des ions multichargés de basse énergie ont permis d'exciter électroniquement des biomolécules isolées tout en transférant très peu d'énergie vibrationnelle. Il est alors possible de comprendre plus précisément la dynamique de fragmentation de ces espèces. Toutefois, dans le cadre de recherches motivées par la volonté de comprendre les effets des radiations ionisantes sur ces systèmes, la pertinence d'une telle approche peut-être remise en cause. En effet, il est clair que les conclusions provenant de travaux sur des biomolécules isolées ne sont pas directement applicables aux molécules présentes dans un environnement biologique, où l'eau est largement présente à hauteur de 50 à 80% [87, 88]. Ceci étant, les études de systèmes biomoléculaires en phase liquide ne contenant que de l'eau, ne sont pas nécessairement plus pertinentes que celles en phase gazeuse. Ceci s'explique par le fait que l'intérieur d'une cellule vivante n'est pas simplement comparable à un volume d'eau liquide. Il a plutôt la consistance d'un gel fortement hétérogène à cause de la présence de nombreuses autres molécules tels que des ADN, ARN, protéines ou sucres. La place prise par ces molécules dans l'environnement cellulaire est considérable et représente entre 10 et 40% du volume total de la cellule [89].

L'étude de systèmes isolés en phase gazeuse dans une approche radiobiologique représente donc une simplification extrême. Dans ce contexte, la prise en compte de la présence d'un environnement autour de la biomolécule constitue une première étape plus réaliste des systèmes biologiques. L'avantage de cette approche intermédiaire est de permettre l'utilisation de techniques propres à la physique, mais aussi et surtout de mettre en évidence l'influence de la présence d'un environnement sur les voies de fragmentation par comparaison avec les biomolécules isolées. Il est aujourd'hui possible d'introduire un environnement simple (des molécules de solvant ou d'autres molécules biologiques) et d'étudier son rôle sur les processus d'ionisation et de dissociation des biomolécules. De plus en plus d'études

s'intéressent au rôle de l'hydratation [90–94], crucial dans les processus biochimiques et dans l'excitation vibrationnelle résultant d'une collision avec des ions. Cette partie est développée dans le chapitre 7. Néanmoins, comme nous venons de le mentionner, la présence d'autres molécules biologiques joue *a priori* un rôle tout aussi important. En ce sens, les études portant sur les agrégats de biomolécules peuvent être vues comme une modélisation de l'environnement cellulaire, créé par la présence d'autres biomolécules. Il est par exemple possible de former des agrégats de nucléobases (adénine, thymine, uracile, cytosine) et de les étudier avec les techniques présentées dans la partie précédente. C'est l'objet de ce chapitre.

5.1 Agrégats purs de nucléobases

5.1.1 Dispositifs expérimentaux

L'approche expérimentale, qui a été utilisée dans ce chapitre, consiste à comparer les spectres de fragmentation obtenus dans le cas des acides nucléiques isolés puis avec des agrégats de ces mêmes molécules. Pour cela, nous avons eu recours à deux dispositifs expérimentaux différents. Les spectres qui concernent les nucléobases isolées proviennent d'expériences que nous avons réalisées au KVI. L'expérience est décrite en détail dans le chapitre 4, page 72. La production des agrégats, quant à elle, nécessite un dispositif dédié qui est installé à Caen. Nous détaillons ci-dessous les modifications apportées à l'expérience présentée dans le chapitre 3, page 34 et qui reviennent essentiellement à changer la partie de production des biomolécules en phase gazeuse.

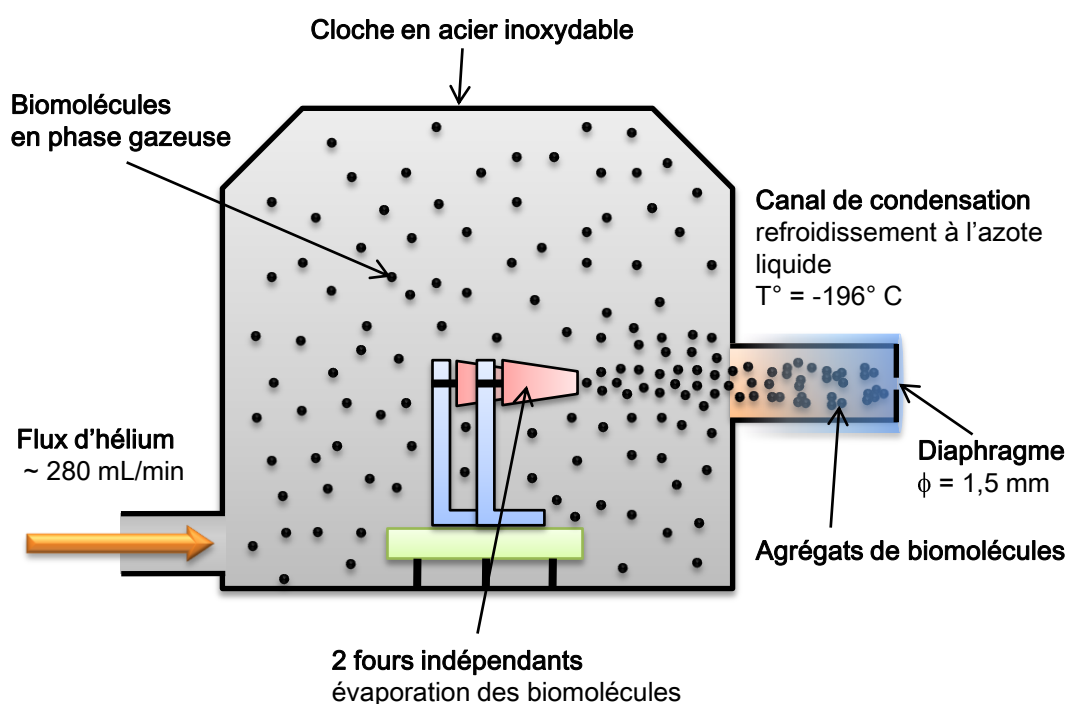


FIGURE 5.1 – Schéma de la source d'agrégation gazeuse.

La méthode utilisée pour produire des agrégats consiste, à partir de biomolécules en phase gazeuse, à entraîner leur condensation et à l'arrêter suffisamment tôt pour permettre la formation d'agrégats de biomolécules. La source d'agrégation gazeuse que nous avons utilisée est inspirée de celle utilisée par C. Bréchnac et collaborateurs [95]. Elle fournit une distribution large d'agrégats neutres non sélectionnés en taille. Un schéma général du dispositif est visible sur la figure 5.1.

Les molécules à agréger sont évaporées dans deux fours. L'utilisation de deux fours indépendants est nécessaire pour la réalisation d'expériences sur les agrégats mixtes, que nous développons brièvement page 114. Pour atteindre la température adéquate (obtenue expérimentalement afin d'atteindre une pression de vapeur saturante suffisante), nous utilisons du fil thermocoaxial¹. La température est contrôlée par un thermocouple. Les températures nécessaires à l'obtention d'une bonne évaporation des différentes poudres de nucléobases sont données, pour indication, dans le tableau 5.1.

Biomolécules	Température
	<i>en degrés Celsius</i>
adénine	180
thymine	185
uracile	190
guanine	330
cytosine	235

TABLE 5.1 – *Températures relevées lors des expériences afin d'obtenir une bonne évaporation des poudres contenues dans les fours*

La poudre évaporée diffuse à travers une ouverture de 2 mm pratiquée dans le capot des fours, puis passe à travers une enceinte parcourue par un jet d'hélium gazeux sous une pression de quelques millibars. Le mélange gazeux entre ensuite dans un canal de condensation, constitué d'un cylindre de cuivre de 50 mm de long et de 15 mm de diamètre et refroidi par une circulation d'azote liquide.

Dans le canal de condensation, la vapeur de biomolécules est en sursaturation. À cause du phénomène de condensation de la vapeur, il y a formation et accroissement de la taille des agrégats par accréation de molécules. La présence d'hélium est particulièrement importante, car l'ajout d'une biomolécule laisse à l'agrégat un excès d'énergie interne (égal à l'énergie de liaison), qui est évacué par les collisions avec ce gaz.

Cette dernière étape dépend de différents paramètres, qui, pour l'essentiel, sont : le temps de passage du mélange gazeux dans le canal de condensation (de l'ordre de quelques ms), du flux d'hélium (200-300 mL/min). En sortie de ce canal, le mélange d'agrégats et d'hélium est accéléré suite à une expansion dans une chambre à vide maintenue à une pression de l'ordre de 10^{-3} mbar. Lorsque la source d'agrégats fonctionne, les pressions résiduelles sont de l'ordre de 10^{-4} mbar, dans l'enceinte de la source, et de quelques 10^{-8} mbar, dans la zone d'interaction, grâce à l'utilisation d'un étage de pompage différentiel. Enfin, au point d'interaction, c'est-à-dire à environ 450 mm du nez du canal de condensa-

1. Fil résistif chauffant par passage d'un courant.

tion, on peut estimer que le diamètre du faisceau d'agrégats est d'environ 4 mm ; le faisceau d'ions multichargés et le jet d'agrégats biomoléculaires se croisant alors à angle droit.

5.1.2 Comparaison entre molécules isolées et agrégats

Molécule de thymine

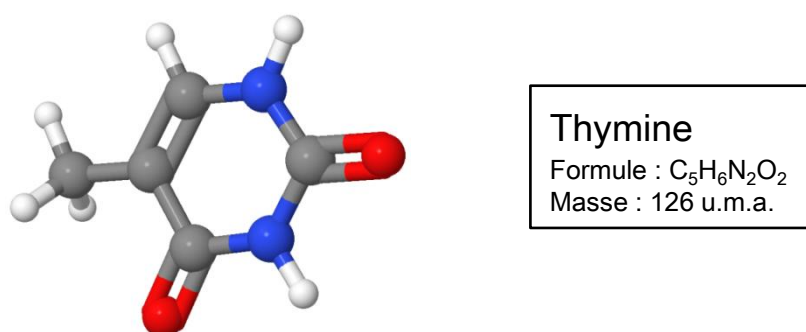


FIGURE 5.2 – Représentation en trois dimensions de la molécule de thymine.

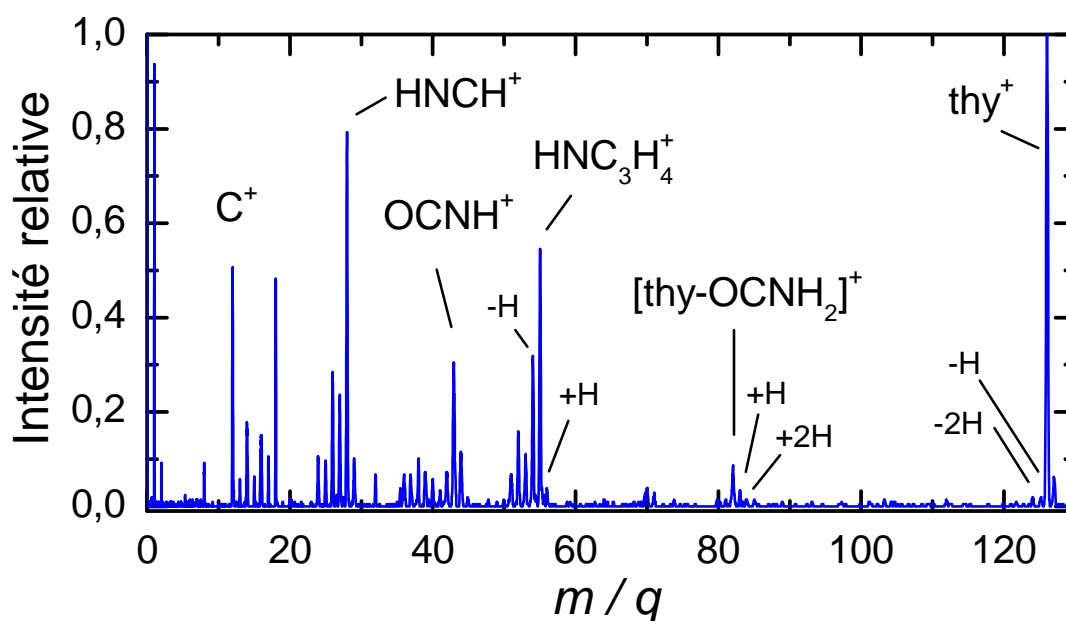


FIGURE 5.3 – Spectre de fragmentation de la molécule de thymine (notée *thy* sur la figure) à la suite de collisions avec des ions multichargés C^{5+} à 60 keV.

Le spectre de fragmentation de la molécule de thymine isolée (figure 5.2) est présenté sur la figure 5.3. Il provient de la collision avec un faisceau d'ions multichargés de C^{5+} à une énergie cinétique de 60 keV. Le pic principal à $m/q = 126$ correspond à la molécule de thymine intacte une fois ionisée. Les fragments principaux correspondent à la formation des espèces $HNCH^+$ et de $HNC_3H_4^+$ consécutive à la rupture de l'hétérocycle.

Le spectre de la figure 5.4 provient de la collision entre un faisceau d' O^{5+} à 50 keV et des agrégats neutres de thymine produits par la source d'agrégation gazeuse. Des agrégats

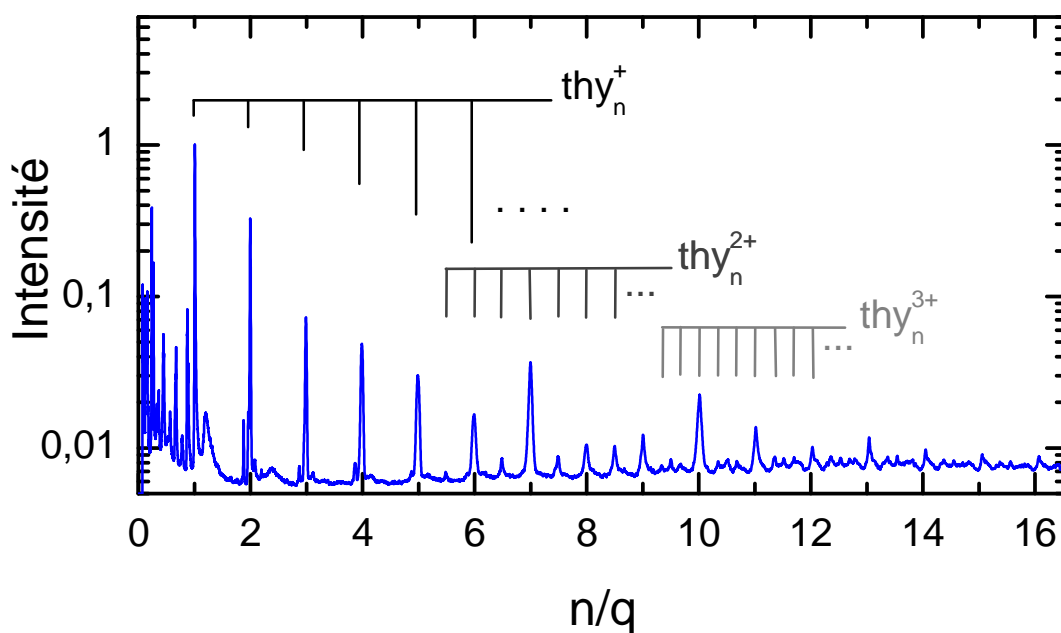


FIGURE 5.4 — Spectre issu de la collision entre des agrégats de thymine neutre du type thy_n^{q+} avec un faisceau d'ions O^{5+} à 50 keV. Le spectre est calibré de façon à représenter directement le rapport n/q , où n est le nombre de molécules de thymine contenues dans l'agrégat.

monochargés de grande taille sont observés, jusqu'à des tailles n égale à une quarantaine de molécules. Des états de charge q supérieurs à l'unité sont également visibles. Les tailles d'apparition qui correspondent à la plus petite taille d'agrégats observés pour une charge donnée peuvent être déterminées. Pour $q = 2$, une taille égale à 11 assure la stabilité de l'agrégat ; pour $q = 3$, il faut un agrégat de taille 28. Nous avons mis en évidence les agrégats facilement identifiables pour $q = 1, 2, 3$. Dans le cas des agrégats monochargés, on observe également la présence d'édifices à la stabilité accrue caractérisés par des pics plus intenses. On observe ainsi les nombres magiques suivants : $n = 7, 10, 13$. Kim et collaborateurs ont également observé les nombres magiques $n = 7$ et $n = 10$ lors d'expériences de photoionisation de la thymine et de l'uracile et les ont attribués à une stabilité renforcée de ces configurations [96].

L'objectif des expériences présentées dans ce chapitre est de voir si les voies de fragmentation des agrégats sont semblables à celles de la molécule isolée, ou si, au contraire, de nouvelles voies de dissociation sont ouvertes du fait de la présence de plusieurs biomolécules dans l'agrégat. Par conséquent, l'aspect le plus intéressant est la fragmentation provenant des agrégats. La figure 5.4 met d'ores et déjà en évidence le fait que pour les masses supérieures au monomère de thymine, les pics observés sur le spectre ne correspondent pratiquement qu'à la formation des agrégats de type thy_n^{q+} . L'interaction provoque essentiellement la dissociation d'une ou de plusieurs molécules de thymine de l'agrégat. Pour observer plus en détail ces voies de fragmentation et les comparer à celles issues de la molécule isolée, nous avons superposé les deux spectres dans la gamme de masse comprise entre 0 et 126 u.m.a.. Cette comparaison est visible sur la figure 5.5. Le spectre en rouge correspond aux agrégats de thymine et la courbe bleue représente le spectre de fragmen-

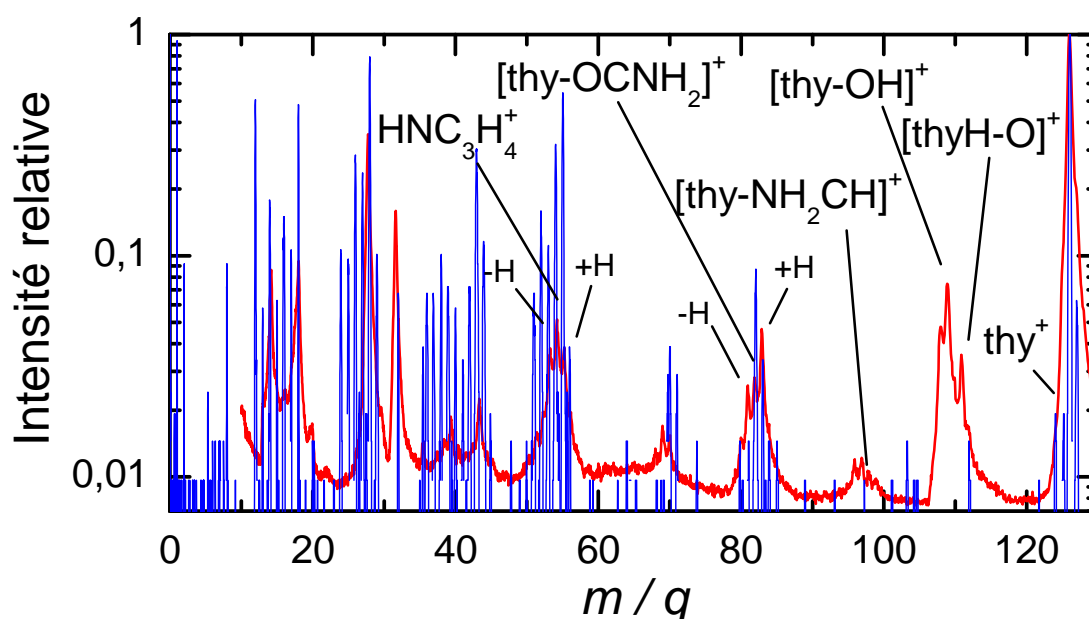


FIGURE 5.5 – Superposition du spectre de fragmentation provenant d'agrégats de thymine (en rouge) avec celui issu de collisions avec la molécule de thymine isolée (en bleu). Seule la région comprise entre $m/q = 0$ et $m/q = 126$ est représentée. Il apparaît clairement des canaux de dissociation supplémentaires dans le cas des agrégats à $m/q = 97$ et $m/q = 109$.

tation de la molécule de thymine isolée. Remarquons que le spectre d'agrégats de thymine est volontairement coupé pour les très faibles masses à cause de la présence du pic d'hélium (gaz support nécessaire au processus d'agrégation) présentant un fort élargissement à sa base. La comparaison des deux spectres montre de façon évidente que la fragmentation diffère suivant qu'il s'agit des agrégats ou de la molécule de thymine isolée. Nous nous abstenons de comparer les intensités des pics entre les deux spectres, ce qui n'aurait pas de sens compte tenu du fait que l'on considère des cibles collisionnelles différentes. Par contre, l'apparition de nouvelles voies de fragmentation, qui ne sont pas observées sur le spectre de la molécule isolée de thymine, démontre que la présence de molécules environnantes modifie la dissociation de cette biomolécule. Ainsi, les espèces $[\text{thy-OH}]^+$ ($m/q = 109$) et $[\text{thy-NH}_2\text{CH}]^+$ ($m/q = 97$) ne sont pas présentes sur le spectre de fragmentation de la thymine isolée. À titre de comparaison, les résultats issus d'expériences de photoionisation [97] ou d'ionisation par impact électronique [98] ne font pas état de la présence du fragment $[\text{thy-OH}]^+$. Quant au fragment de $m/q = 97$, il n'apparaît qu'à l'état de traces. À l'inverse, la perte de OH est caractéristique des expériences de collisions réalisées avec la thymine en phase condensée. Il semble donc que l'environnement que constitue un agrégat soit suffisant pour permettre la formation de canaux de fragmentation spécifiques à la phase condensée. Ceci est d'autant plus intéressant que la perte de OH ne peut s'expliquer que par rupture d'une liaison intermoléculaire. En effet, les études de phase condensée indiquent que le fragment est produit par la cassure d'une liaison en dehors de l'hétérocycle [99].

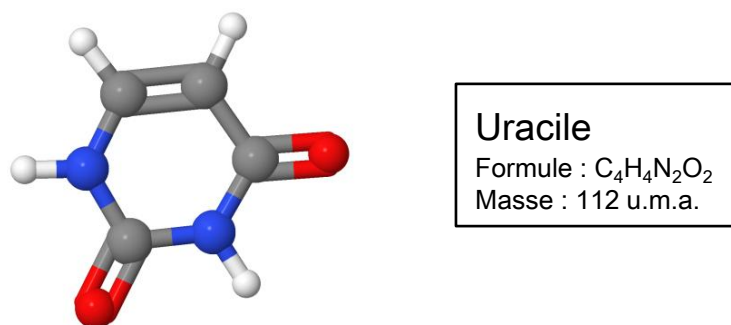


FIGURE 5.6 – Représentation en trois dimensions de la molécule d'uracile.

Molécule d'uracile

Nous avons suivi la même démarche dans le cas de la molécule d'uracile (figure 5.6) de rapport $m/q = 112$. La figure 5.7 est un spectre de fragmentation de cette nucléobase obtenu après interaction avec un faisceau d'ions C^{5+} à 48 keV d'énergie cinétique. Le pic le plus intense est celui de la molécule intacte. Trois fragments dominants sont également observés sur ce spectre et correspondent également aux espèces majoritaires obtenues dans les expériences de photoionisation [97] et d'ionisation par impact électronique [98]. Il s'agit de $C_3H_3NO^+$ ($m/q = 69$), de $C_2H_2O^+$ ($m/q = 42$) et $HCNH^+$ ($m/q = 28$).

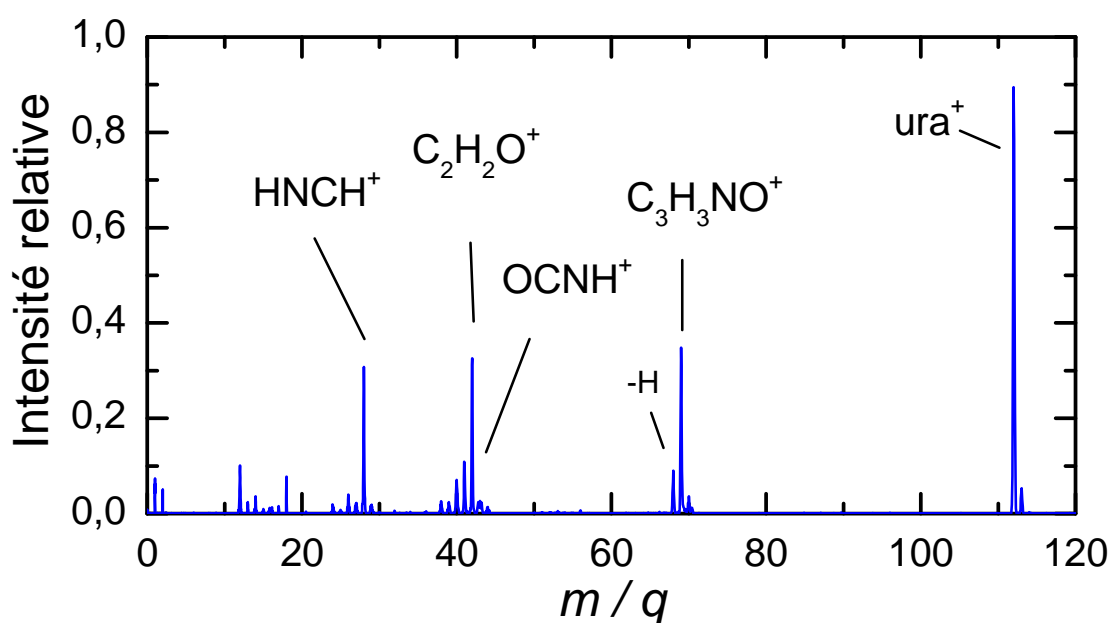


FIGURE 5.7 – Spectre de fragmentation de la molécule d'uracile (notée ura sur la figure) à la suite de collisions avec des ions multichargés C^{5+} à 48 keV.

Le spectre de fragmentation des agrégats d'uracile est porté sur la figure 5.8. Il provient de la collision avec un faisceau d' O^{5+} à 100 keV d'énergie cinétique. Ici, seuls les états de charge $q = 1$ et $q = 2$ peuvent être assignés sans ambiguïté. On observe également la présence de nombres magiques pour les tailles $n = 7, 10$, comme cela a déjà été observé pour la thymine. Dans la région $n/q < 1$, apparaît la fragmentation de molécules d'uracile

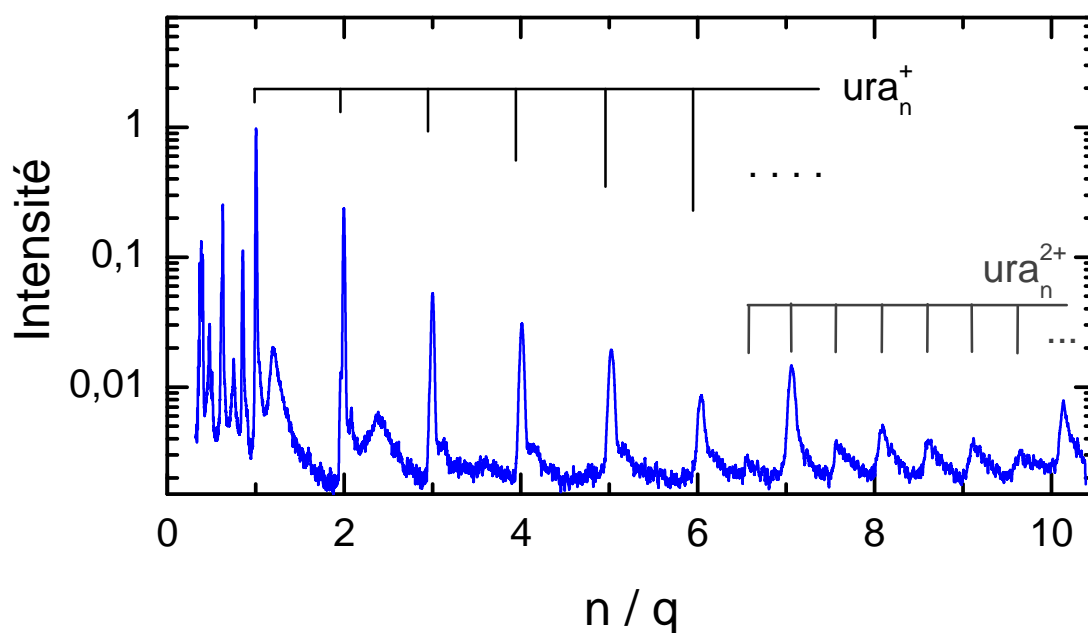


FIGURE 5.8 – Spectre provenant de la collision entre des agrégats d'uracile neutre du type ura_n^{q+} avec un faisceau d'ions O^{5+} à 100 keV. Le spectre est calibré de façon à représenter directement le rapport n/q , où n est le nombre de molécules d'uracile contenues dans l'agrégat.

contenues dans les agrégats. Ainsi, il est possible de comparer directement les voies de fragmentation provenant de la molécule isolée et celles issues des agrégats d'uracile (voir figure 5.9). Le spectre confirme le résultat déjà observé dans le cas de la thymine, à savoir que de nouveaux canaux de dissociation apparaissent dans le cas des agrégats. En particulier, la formation des fragments $[\text{ura-OH}]^+$ ($m/q = 95$) et $[\text{ura-HCO}]^+$ ($m/q = 83$) est caractéristique des agrégats d'uracile, puisque ces espèces ne sont pas observées dans le cas de la fragmentation de la molécule d'uracile isolée induite par des ions multichargés de basse énergie. Notons que le cation $[\text{ura-HCO}]^+$ n'est ni présent sur les spectres d'ionisation par impact électronique [98], ni sur ceux de photoionisation [97].

Molécule d'adénine

La figure 5.11 correspond au spectre de fragmentation de la molécule d'adénine (figure 5.10) suite à des collisions avec un faisceau d'ions C^{5+} à 65 keV. Cette fois, le pic principal n'est pas la molécule intacte monochargée à $m/q = 135$, mais le fragment HNCH^+ ($m/q = 28$). Sont également observées les espèces $[\text{ade-HCN}]^{5+}$ ($m/q = 108$), C_2HN_2^+ ($m/q = 53$), C_2N^+ ($m/q = 38$). On remarque également l'apparition de la molécule d'adénine doublement chargée ade^{2+} ($m/q = 67,5$). La formation de ce dication est spécifique aux ions multichargés de basse énergie, puisqu'il n'est pas produit par photoionisation [97] ou par impact électronique [100].

Quelques différences notables par rapport aux pyrimidines (thymine et uracile) peuvent être mentionnées dans le cas des agrégats d'adénine. Le spectre de fragmentation provenant de la collision avec O^{5+} à 50 keV fait ressortir que l'intensité des agrégats d'adénine décroît

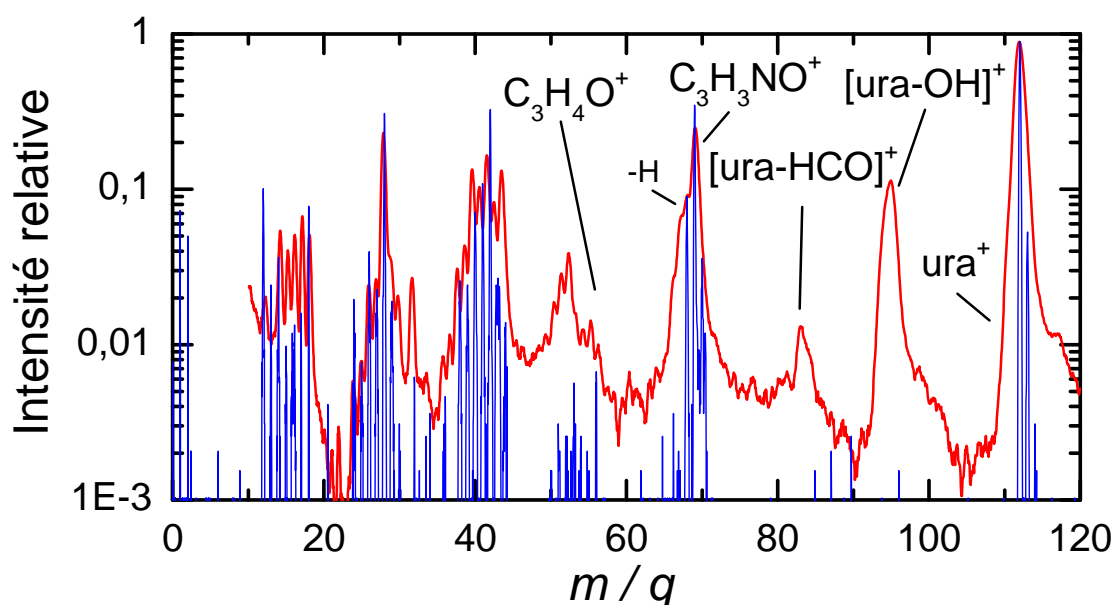


FIGURE 5.9 – Superposition du spectre de fragmentation provenant d'agrégats d'uracile (en rouge) avec celui issu de collisions avec la molécule d'uracile isolée (en bleu). Seule la région comprise entre $m/q = 0$ et $m/q = 120$ est représentée. Il apparaît clairement des canaux de dissociation supplémentaires dans le cas des agrégats à $m/q = 83$ et $m/q = 95$.

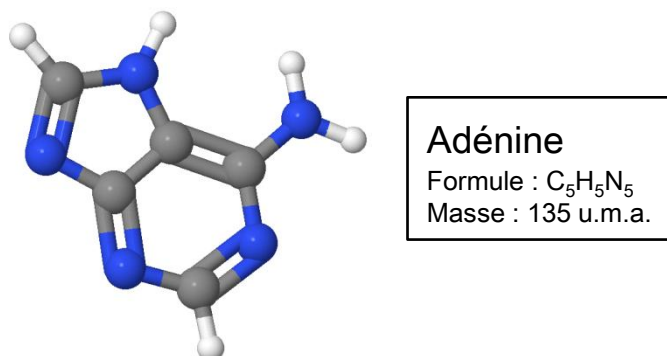


FIGURE 5.10 – Représentation en trois dimensions de la molécule d'adénine.

presque continûment en fonction du rapport n/q . Ainsi, dans le cas de l'agrégation de l'adénine, il existe des effets de couche plus faibles que dans les cas de la thymine ou de l'uracile. En ce qui concerne les états de charge, $q = 1$ et $q = 2$ sont bien visibles et il est possible de distinguer dans le spectre des agrégats triplement chargés (non annotés). La formation du dication d'adénine dans le spectre de la molécule isolée pouvait laisser penser que la taille d'apparition de l'agrégat doublement chargé serait plus petite qu'avec la thymine et l'uracile. Ce n'est pas le cas puisque l'on a $n_{app} = 15$ pour l'adénine, alors que nous avons respectivement pour la thymine et l'uracile $n_{app} = 11$ et $n_{app} = 13$.

Comme nous l'avons fait avec les deux autres nucléobases, il est légitime de regarder si la fragmentation change selon que la cible est une molécule isolée d'adénine ou un agrégat. Le résultat de la comparaison des deux spectres se trouve sur la figure 5.13. Dans la continuité des résultats obtenus avec les pyrimidines, l'apparition de $[ade-NH_3]$

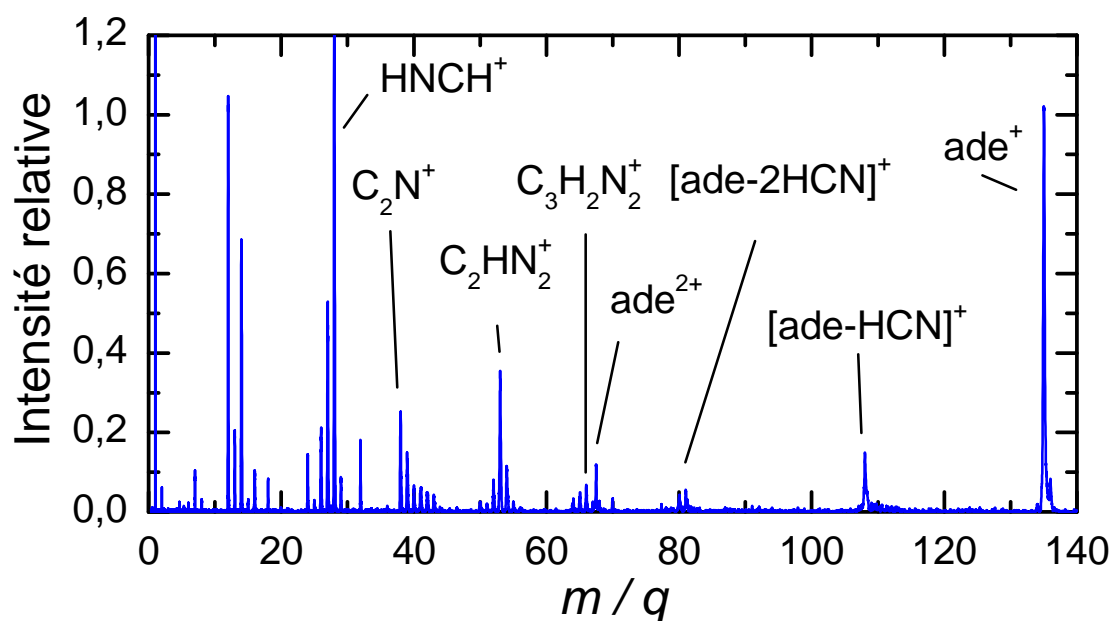


FIGURE 5.11 – Spectre de fragmentation de la molécule d'adénine (notée *ade* sur la figure) à la suite de collisions avec des ions multichargés C^{5+} à 65 keV.

($m/q = 118$) et celle, moins marquée, de $C_4H_2N_3^+$ ($m/q = 92$) confirme l'ouverture de nouvelles voies de dissociation avec les agrégats de nucléobases.

Ainsi, des différences notables entre les voies de dissociation des agrégats et des molécules isolées démontrent que la prise en compte de la présence d'un environnement, même simple, modifie la réponse des biomolécules à une excitation électronique induite par des ions multichargés de basse énergie. Outre cet aspect particulièrement important, les résultats mettent en évidence des différences dans la stabilité des agrégats considérés dans cette étude. Alors que des nombres magiques sur les spectres des agrégats de pyrimidines sont évidents (pour $n = 7, 10, 13$ dans le cas de la thymine et pour $n = 7, 10$ avec l'uracile), l'intensité des agrégats d'adénine décroît de façon quasi-monotone². La figure 5.14 montre explicitement l'évolution de l'intensité des agrégats de ces trois nucléobases en fonction de leur taille. La décroissance de l'intensité des pics est ainsi plus marquée dans le cas de l'adénine que pour les pyrimidines. Les tailles d'apparition que nous avons déterminées précédemment reflètent également la stabilité des agrégats. En effet, des tailles d'apparition petites correspondent généralement à des agrégats plus stables, puisque cela signifie que ces systèmes sont capables de porter une charge supplémentaire à partir d'une plus petite taille. La tendance d'une plus grande stabilité des agrégats de pyrimidines est ici également confirmée. Les plus petits systèmes doublement chargés correspondent effectivement à thy_{11}^{2+} , ura_{13}^{2+} et ade_{15}^{2+} . Il faut néanmoins rester prudent quant à une interprétation immédiate de ces résultats. La formation d'agrégats positivement chargés est un processus complexe qui dépend à la fois de la formation des agrégats à proprement

2. Des effets de couche plus faibles sont néanmoins toujours présents dans le cas de l'adénine, comme indiqué précédemment.

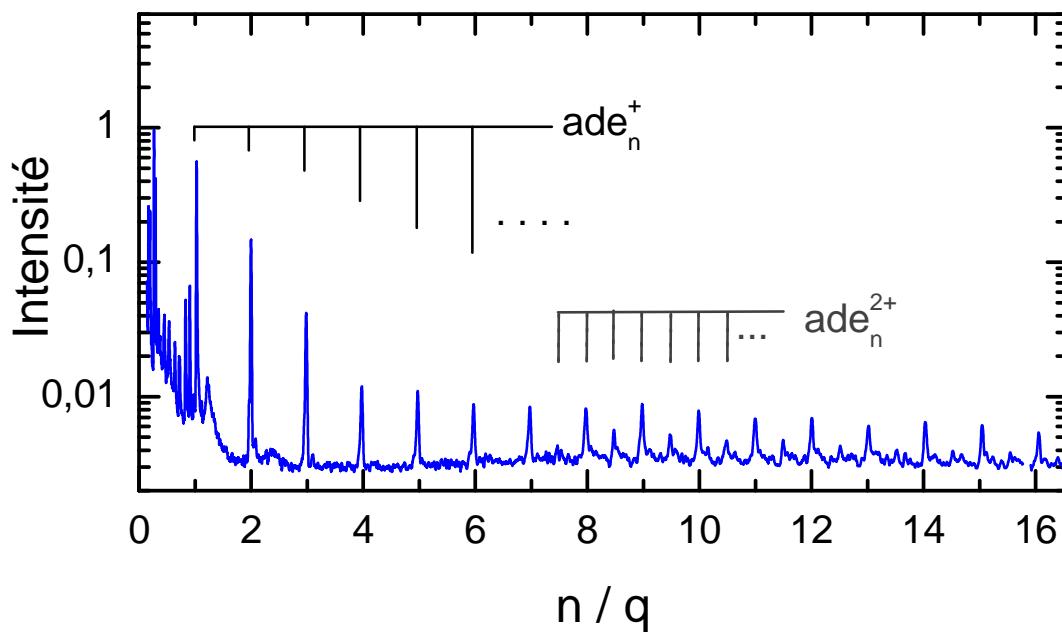


FIGURE 5.12 – Spectre issu de la collision entre des agrégats d’adénine neutre du type ade_n^{q+} avec un faisceau d’ions O^{5+} à 50 keV. Le spectre est calibré de façon à représenter directement le rapport n/q , où n est le nombre de molécules d’adénine contenues dans l’agrégat.

parler (et donc, entre autres, des énergies de liaisons), mais aussi des potentiels d’ionisation, à cause de la collision. Un certain nombre d’études se sont focalisées sur la stabilité des dimères neutres de nucléobases. Deux types de liaisons conduisent à la formation de dimères (voir figure 5.15). D’un côté, les systèmes planaires qui sont basés sur des liaisons hydrogènes ; de l’autre, les systèmes empilés stabilisés par des interactions dispersives (de type van der Waals) [101]. Kelly et collaborateurs ont montré que les géométries les plus stables provenaient d’agrégats planaires à liaisons hydrogènes, pour lesquelles les énergies de liaisons sont plus élevées [102, 103]. Le dimère le plus stable est celui d’adénine avec une énergie de liaison de 0,86 eV, suivi de la thymine (0,82 eV) puis de l’uracile (0,71 eV). Remarquons que cet ordre ne coïncide pas avec les conclusions que nous avons mentionnées en rapport avec les tailles d’apparition. Par ailleurs, nous avons évoqué l’importance des potentiels d’ionisation lors des collisions avec le faisceau d’ions. D’après les travaux de Joachims et collaborateurs [97], les potentiels d’ionisation des monomères d’adénine, de thymine, et d’uracile sont respectivement de 8,2, 8,82 et 9,15 eV. Précédemment, Kim et collaborateurs [104] ont montré que la formation de dimères conduisait à une augmentation d’environ 0,5 eV des potentiels d’ionisation. Cela indique, pour un rapprochement avec nos résultats, que l’ordre établi pour le monomère reste valable dans le cas des dimères. Comme on peut le constater sur la figure 5.14, les intensités obtenues pour le dimère ne sont pas en accord avec cet ordre. L’écart observé rend compte de la complexité des processus mis en jeu dans cette expérience, complexité qui rend l’analyse fine des données relativement compliquée.

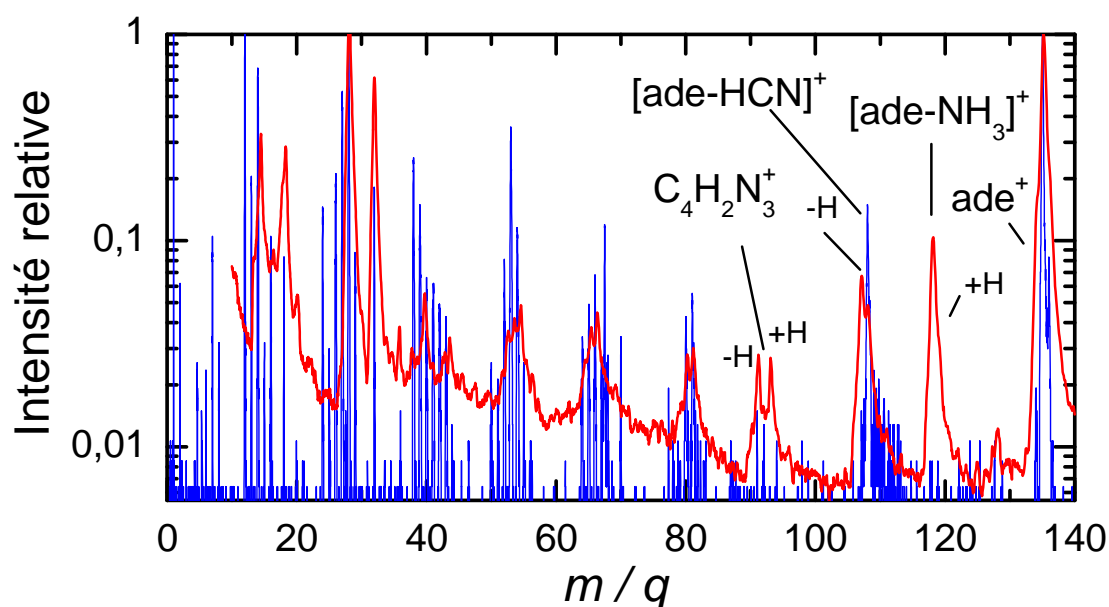


FIGURE 5.13 — Superposition du spectre de fragmentation provenant d'agrégats d'adénine (en rouge) avec celui issu de collisions avec la molécule d'adénine isolée (en bleu). Seule la région comprise entre $m/q = 0$ et $m/q = 140$ est représentée. Bien que moins marqué que pour la thymine et l'uracile, des canaux de dissociation supplémentaires apparaissent dans le cas des agrégats. En particulier, la perte du groupement NH_3 à $m/q = 118$.

5.1.3 L'apport des coïncidences

La comparaison des spectres de fragmentation des nucléobases isolées avec ceux issus des agrégats a mis en évidence de nouvelles voies de fragmentation dans le cas des agrégats. La question est alors de savoir à partir de quelle taille d'agrégat se produit la transition entre la molécule isolée et celle prise dans un environnement chimique. L'apparition de ces nouveaux fragments est-elle due à certains agrégats en particulier ? Dans la partie précédente, nous avons montré que les espèces supplémentaires formées étaient aussi présentes dans les expériences en phase condensée [99, 106]. À partir de quelle taille observe-t-on des fragments similaires à ceux de la phase condensée ? La source d'agrégation gazeuse ne permet pas de sélectionner directement la taille des agrégats formés. La température du four ou la pression du gaz d'hélium ne permettent en réalité que de modifier légèrement la taille moyenne des agrégats de nucléobases. Il est donc nécessaire d'avoir recours à une méthode de détermination de la taille initiale *a posteriori*. Nous avons alors eu recours à la technique de la détection en coïncidence des fragments positifs, que nous avons largement décrite dans la partie 4.1.1 du chapitre 4. Précisément, nous avons utilisé le même dispositif de détection que celui qui est présent à KVI, à ceci près qu'il s'agit, à Caen, d'un spectromètre linéaire à temps de vol de type Wiley-McLaren [58] au lieu d'un reflectron. À partir des données expérimentales de temps de vol, nous avons extraits les événements pour lesquels deux « stop » ont été enregistrés. Cela signifie que nous avons isolé les collisions ayant formé deux fragments positifs de rapport m/q différents. Ces deux espèces détectées proviennent d'une double ou d'une multiple ionisation ayant conduit à la fragmentation de l'agrégat parent.

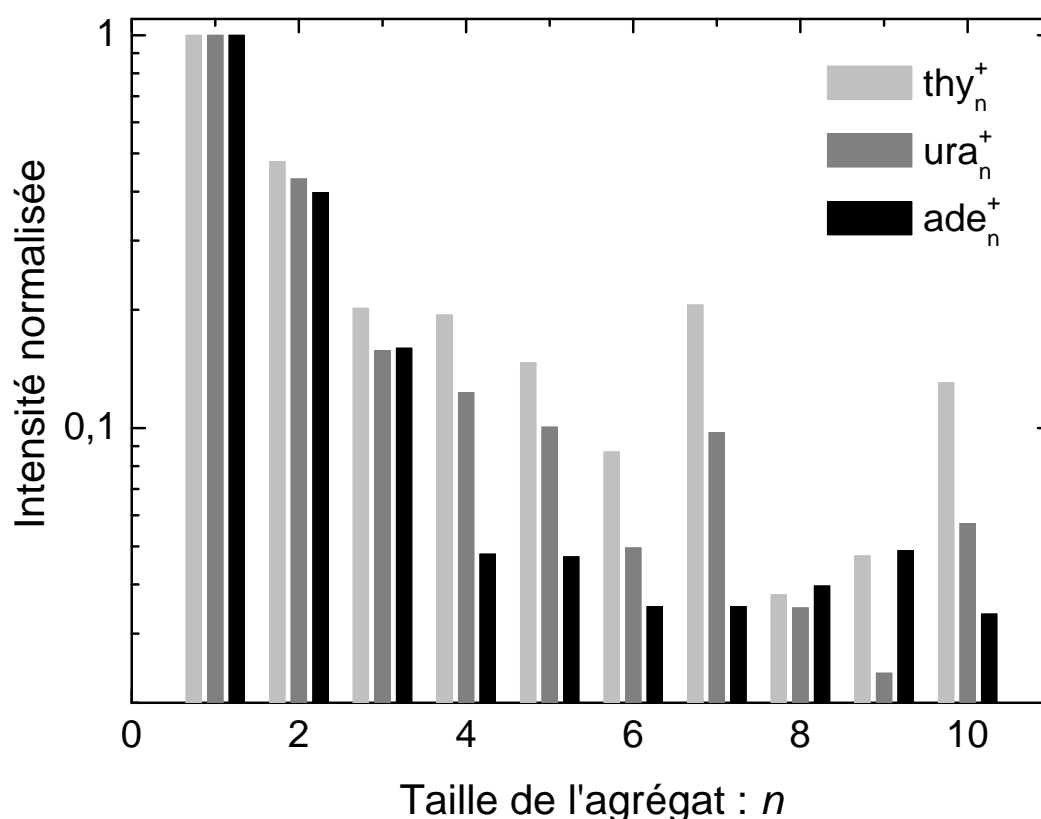


FIGURE 5.14 – Intensités des agrégats de thymine, uracile et adénine en fonction de la taille de l'agrégat. Les données sont extraites des spectres des figures 5.5 5.9, 5.13 et sont normalisées à l'intensité du monomère.

L'émission de fragments neutres est également probable et la somme des rapports m/q des cations détectés est alors inférieure à celle de l'agrégat parent. Cependant, si l'on ne prend pas en compte la possibilité de phénomènes d'évaporation, on peut obtenir un ordre d'idée de la taille des agrégats parents. C'est sur cette base que le traitement des données a été effectué. Ainsi, même sans sélection en masse initiale, une estimation de la taille peut être déterminée à partir des données de détection en coïncidence.

La figure 5.16 représente 7 spectres issus de la détection corrélée de deux fragments positifs, où l'un des fragments est l'espèce thy_n^+ . L'autre fragment possède un rapport m/q compris entre 30 et 120. Chacun des spectres de cette figure fait ressortir le type de cations qui est émis lorsque l'on détecte le monomère de thymine thy^+ ($n = 1$), le dimère de thymine thy_2^+ , le trimère de thymine thy_3^+ et ainsi de suite. Une mise à l'échelle commune a été réalisée de sorte que l'intensité de $[\text{thy-OH}]^+$ ($m/q = 109$) soit identique sur tous les spectres. Trois remarques essentielles peuvent être formulées à partir de ce graphique. D'abord, que l'espèce $[\text{thy-OH}]^+$ ($m/q = 109$), fragment observé uniquement dans le cas des agrégats, est la plus intense même lorsque l'agrégat parent³ est le dimère (c'est-à-dire pour $k = 1$). Ensuite, parce que l'allure générale des spectres est indépendante de la taille

3. On le considère comme parent au bémol du phénomène d'évaporation, que l'on suppose identique pour tous les n .

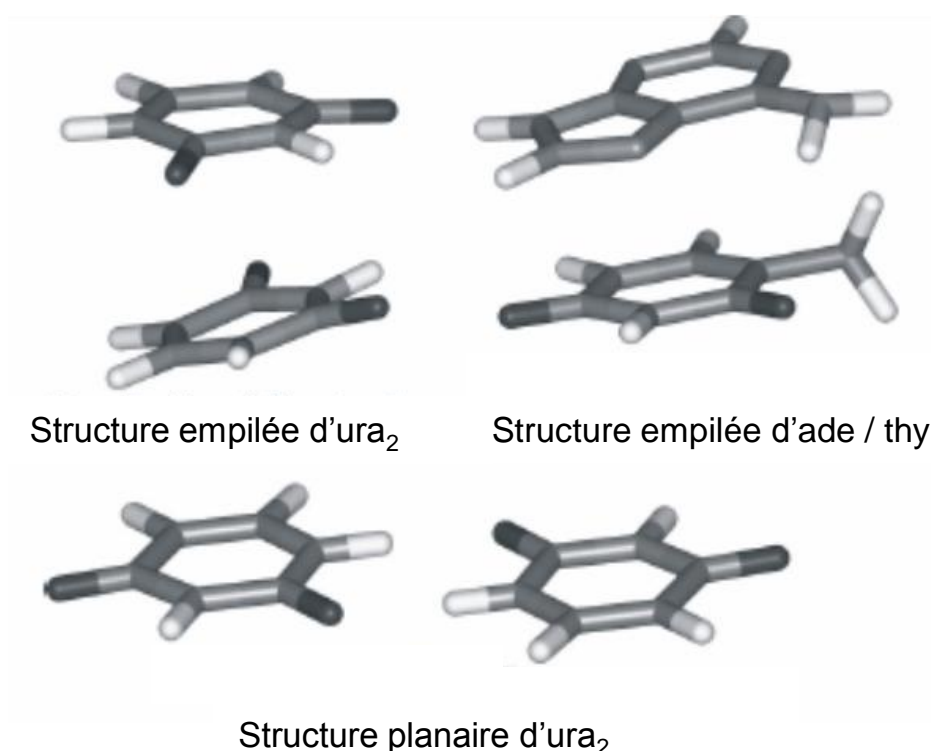


FIGURE 5.15 – Deux types de structures sont en compétition pour les dimères de nucléobases : une structure planaire reposant sur des liaisons hydrogènes et une structure empilée faisant intervenir des interactions dispersives. En haut à gauche, structure empilée d'ura₂. En haut à droite structure empilée de adénine / thymine. En bas, structure planaire d'ura₂. Reproduit de la référence [105].

de l'agrégat de thymine initial. On constate en effet peu de différences entre les 7 spectres. Enfin, s'il l'on regarde un peu plus en détail, on s'aperçoit que l'intensité de certains fragments est plus importante pour des tailles d'agrégats données. C'est en particulier le cas de l'espèce $[\text{thy-NH}_2\text{CH}]^+$ à $m/q = 97$ (identifiée par une colonne grise sur le graphique) dont la contribution au spectre est très faible pour $k = 1$, mais devient maximum pour $k = 4$ et $k = 5$.

Une autre représentation de l'intensité des fragments détectés en coïncidence avec les espèces thy_n^+ se trouve sur la figure 5.17. L'intégrale des pics des fragments $[\text{thy-OH}]^+$, $[\text{thy-NH}_2\text{CH}]^+$, $[\text{thy-OCNH}_2]^+$ et HCN_3H_4^+ observés en coïncidence avec l'espèce thy_n^+ a été portée sur cette figure. Les symboles pleins correspondent aux fragments qui apparaissent à la fois pour la molécule isolée et pour les agrégats ; les symboles creux sont ceux spécifiquement observés avec les agrégats. On constate que l'intensité des nouvelles espèces formées dans le cas des agrégats est supérieure à celle des fragments communs à la molécule isolée, même lorsque la taille de l'agrégat parent augmente.

Ainsi, les mesures indiquent que les nouvelles voies de fragmentation caractéristiques des agrégats apparaissent dès les plus petites tailles d'agrégats. De plus, lorsque la taille de l'agrégat augmente, l'intensité de ces canaux de fragmentation semble rester supérieure à celle des espèces produites également avec la molécule isolée. Par conséquent, ces voies

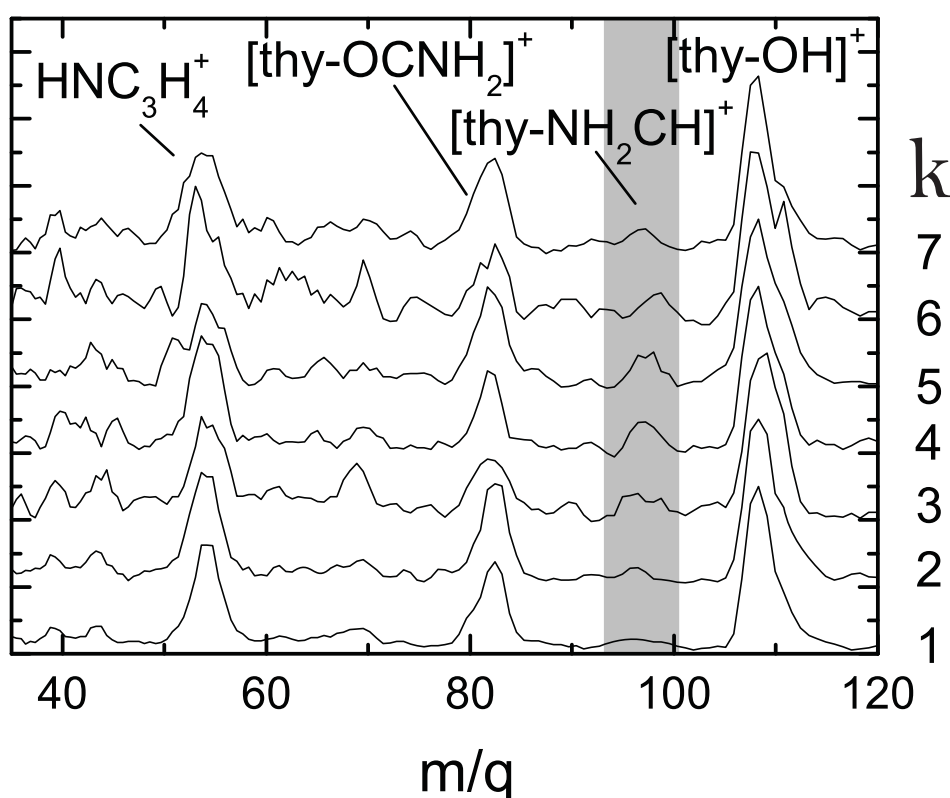


FIGURE 5.16 – Spectres de coïncidence mettant en évidence le type de cations émis en corrélation lors de la détection de l'espèce thy_k^+ de taille k (variant entre 1 et 7). Ces données sont obtenues lors de la collision d'agrégats neutres de thymine avec des ions O^{5+} à 50 keV. Remarquons que des espèces, comme $[\text{thy-NH}_2\text{CH}]^+$ (colonne grise), sont plus présentes pour certaines tailles d'agrégats.

de dissociation, également observées dans la phase condensée, sont mises en évidence dès qu'une autre biomolécule est présente. La formation de l'espèce $[\text{thy-OH}]^+$, par exemple, est déjà présente avec les petites tailles d'agrégats⁴. Cette conclusion peut être rapprochée des calculs de structures des dimères de nucléobases que nous avons évoqués précédemment. Kelly et Kantorovich [102] ont montré que les dimères les plus stables correspondaient à la formation de liaisons hydrogènes entre atomes d'oxygène accepteurs et atomes d'hydrogène donneurs. La figure 5.18 présente la géométrie du dimère de thymine le plus stable. L'interaction qui a lieu entre deux thymines est essentiellement limitée aux régions des liaisons hydrogènes. En conséquence, la structure électronique est largement modifiée dans cette région. L'accroissement de la taille de l'agrégat conduit à affaiblir les liaisons intramoléculaires dans la région de la liaison hydrogène. En effet, l'augmentation des interactions intermoléculaires au niveau des atomes d'oxygène et d'hydrogène tend à réduire l'énergie des liaisons intramoléculaires au niveau de ces atomes. Cette explication va dans le sens des observations que nous avons exposées puisque, lors de la dissociation des agrégats de thymine, les atomes d'oxygène et d'hydrogène seront particulièrement affectés par la

4. Remarquons qu'il faut rester prudent sur la détermination précise de la taille de l'agrégat parent, à partir de laquelle les nouvelles voies de fragmentation apparaissent, puisque des phénomènes d'évaporation sont possibles.

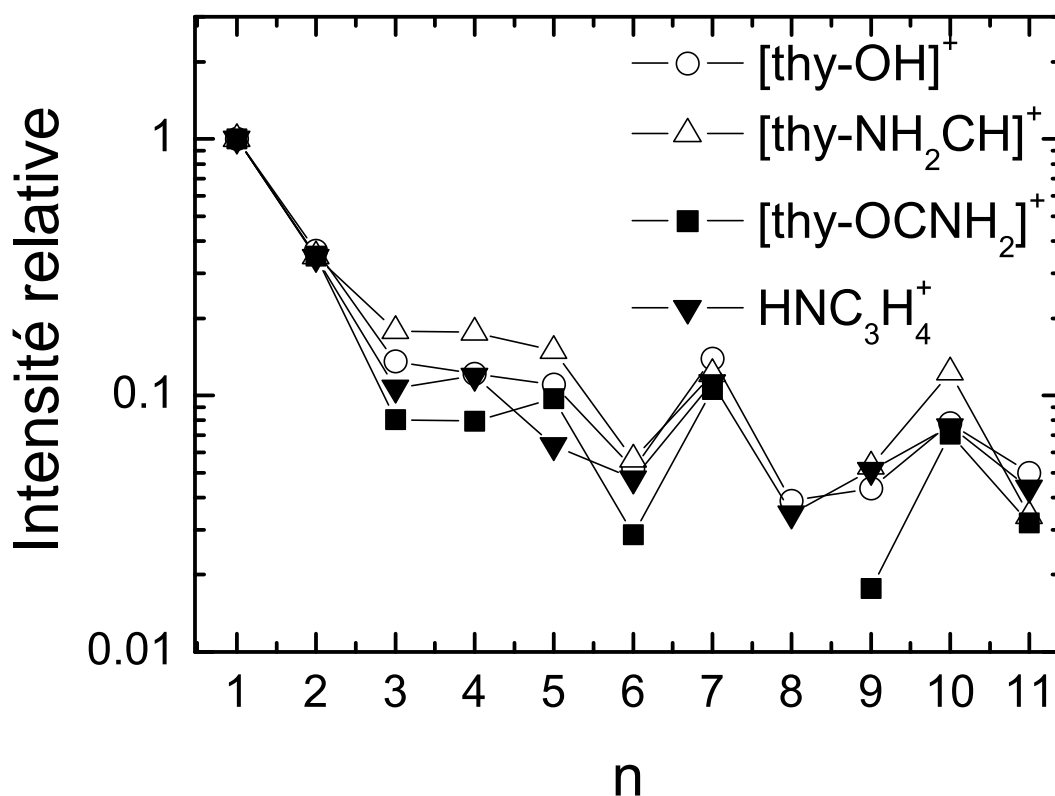


FIGURE 5.17 – Représentation sur une échelle logarithmique de l'intégrale des pics des fragments $[thy-OH]^+$, $[thy-NH_2CH]^+$, $[thy-OCNH_2]^+$ et $HNC_3H_4^+$ observés en coïncidence avec l'espèce thy_n^+ . Ces données sont obtenues lors de la collision d'agrégats neutres de thymine avec des ions O^{5+} à 50 keV. L'intensité des fragments produits lors de la détection du cation thy^+ a été normalisée à 1.

présence d'une ou de plusieurs autres thymine. Il est légitime de penser que l'espèce $[thy-OH]^+$ ($m/q = 109$) provient de la perte d'un hydrogène et d'un oxygène impliqués dans ces liaisons.

Cette conclusion est d'autant plus intéressante, parce qu'elle tend à montrer, que même au delà du dimère de thymine, c'est une structure planaire qui est privilégiée pour ces agrégats. L'observation de la perte de OH pour tous les agrégats jusqu'à une taille $n = 8$ montre que leur cohésion est assurée par des liaisons hydrogènes (avec une structure planaire) au détriment de liaisons dues aux forces dispersives (avec une structure empilée dans ce cas). Pour confirmer ceci, l'équipe de Thomas Schlathölter, avec laquelle nous avons collaboré pour cette expérience, a réalisé des calculs de chimie quantique⁵ pour déterminer les structures stables des agrégats de thymine jusqu'à une taille $n = 5$. Les géométries déterminées pour les trimères, tétramères et pentamères sont planaires et font intervenir des liaisons hydrogènes. Remarquons toutefois qu'une légère déviation à la planéité des structures est observée pour le pentamère. De la même façon que pour le dimère, les liaisons impliquées dans la structure des agrégats de thymine sont de type hydrogène. Il semble

5. L'optimisation de différentes géométries de départ a été conduite au niveau de théorie B3PW91/6-31G(d). Le calcul de l'énergie de stabilisation a nécessité le recours à une base plus développée : B3PW91/6-31+G(2df,2p).

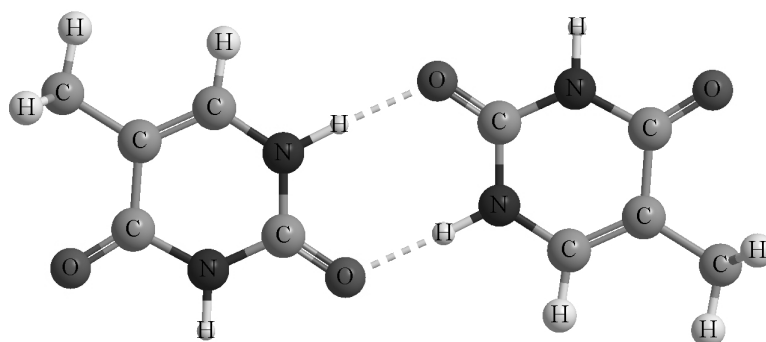


FIGURE 5.18 — Géométrie du dimère neutre de thymine thy_2 correspondant à une structure plane faisant intervenir deux liaisons hydrogènes.

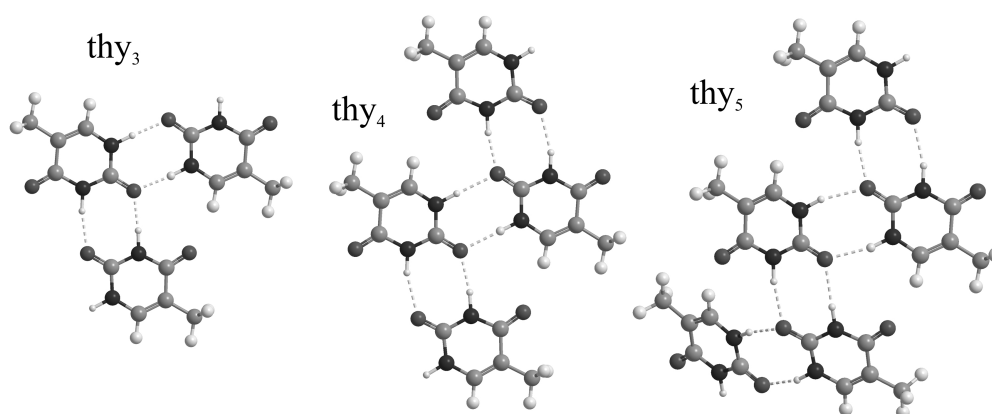


FIGURE 5.19 — Géométries des agrégats neutres de thymine thy_n optimisée au niveau B3PW91/6-31G(d). Les lignes en pointillés mettent en évidence les liaisons hydrogènes.

ainsi que les structures empilées ne jouent pas de rôle dans la formation des agrégats en phase gazeuse. Ces calculs viennent confirmer les observations expérimentales et montrent le rôle dominant que jouent ces liaisons à la fois en phase condensée et en phase gazeuse. Les expériences de fragmentation, qui résulte des collisions avec les ions multichargés, ont donc permis de mettre en évidence la structure particulière de ces agrégats de nucléobases. Concernant le calcul, il convient de préciser que la théorie de la fonctionnelle de la densité donne des prédictions relativement précises dans le cas des liaisons hydrogènes. Par contre, cette théorie n'est pas particulièrement adaptée à la détermination des minima de la surface d'énergie potentielle dans le cas des structures empilées, à cause de l'importance que jouent les forces dispersives dans ce cas. Les calculs des structures empilées nécessitent d'avoir recours à des niveaux de théorie élevés [107]. En particulier, il a été montré que le choix d'une base plus développée pour ce type de structures aboutit à une énergie de stabilisation plus élevée de 40 kJ/mol. Il faut donc rester prudent sur le rôle réel que peuvent jouer les structures empilées, même si les comparaisons avec l'expérience confirment les résultats des calculs.

Enfin, il est intéressant de noter que les structures empilées peuvent être produites expérimentalement en phase gazeuse en formant des agrégats de nucléobases méthylées, ce qui empêche la formation de liaisons hydrogènes [108, 109].

5.2 Agrégats mixtes de nucléobases

Dans les cellules biologiques, les enzymes qui synthétisent les molécules d'ADN assemblent les bases en formant des paires selon une structure dite de Watson-Crick [2]. En phase gazeuse, l'absence de squelette en double hélice et de solvant environnant permet la formation de nombreuses autres conformations. La question de savoir si les paires de nucléobases trouvées dans l'ADN cellulaire sont également celles formées de façon préférentielle dans les processus d'agrégation en phase gazeuse a été posée par Dey et collaborateurs en 1994 [110]. Cette équipe a montré en particulier que la formation dans un jet supersonique de paires de bases complémentaires adénine-thymine et guanine-cytosine est favorisée par rapport à des paires constituées d'une seule espèce moléculaire ou des paires non complémentaires.

De nombreuses études théoriques ont été menées par Hobza et collaborateurs [111] afin de déterminer les différentes possibilités de formation de paires de bases. Ces travaux ont été résumés récemment par Kelly et Kantorovich [112]. Il semble ainsi que la structure de Watson Crick est la conformation la plus stable en phase gazeuse pour le dimère de guanine-cytosine, mais pas pour la paire adénine-thymine.

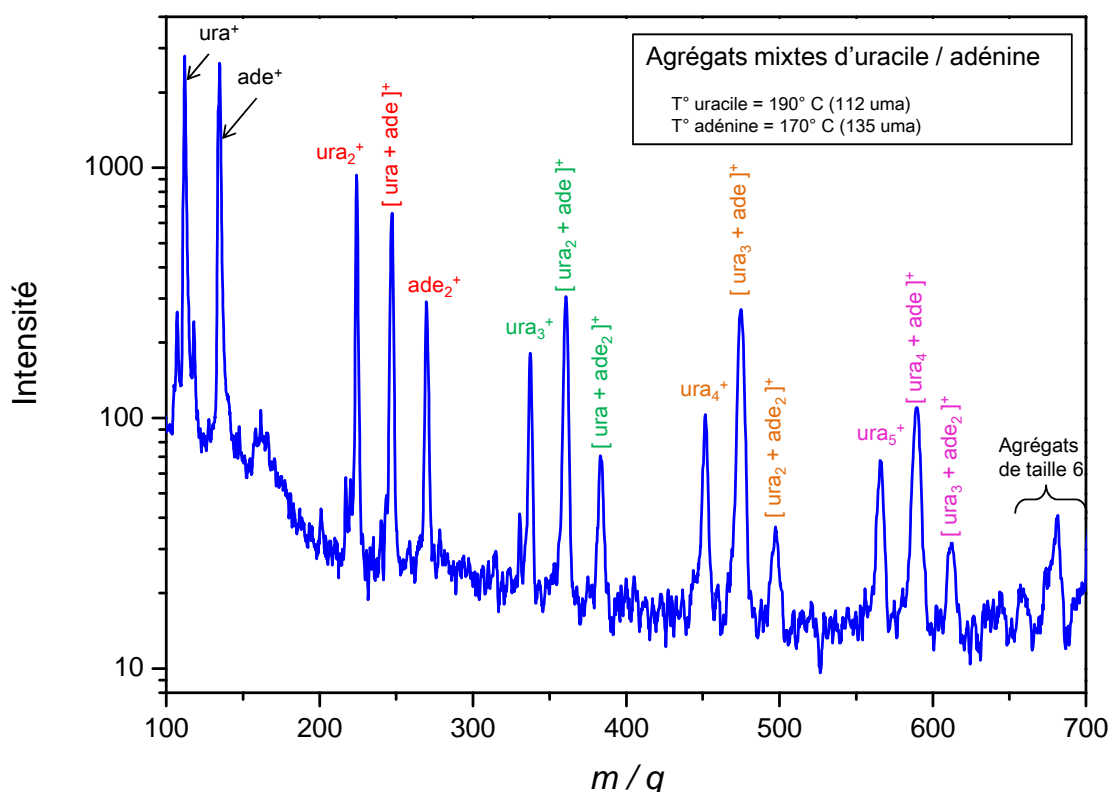


FIGURE 5.20 — Spectre de masse d'agrégats mixtes d'uracile (ura) et d'adénine (ade) formés par une source d'agrégation gazeuse et ionisés par des ions O^{5+} à 50 keV. Ces deux acides nucléiques sont impliqués dans la formation de paires de Watson Crick dans la molécule d'ADN.

Dans ce contexte, nous avons réalisé un spectre de fragmentation d'agrégats mixtes d'uracile (base complémentaire de l'adénine dans l'ARN) et d'adénine en collision avec

un faisceau d'O⁵⁺ à 50 keV d'énergie cinétique, qui est présenté sur la figure 5.20. On identifie clairement des agrégats jusqu'à la taille 6 et chaque taille d'agrégats est identifiée par une couleur différente. À l'intérieur de chaque groupe (monomère, dimère, trimère, etc.), il est intéressant de noter la répartition des espèces dans la constitution de l'agrégat. Les molécules d'uracile et d'adénine simplement chargées sont bien visibles à gauche du spectre à $m/q = 112$ et $m/q = 135$ u.m.a., respectivement. Pour le dimère, on constate l'apparition de ura₂, [ura+ade] et ade₂. En ce qui concerne le trimère, le pic dominant correspond à [ura₂+ade], suivi de ura₃ et [ura+ade₂]. Remarquons que l'agrégat ade₃ n'est pas présent. À nouveau pour les agrégats de taille 4 et 5, le pic le plus intense correspond à la présence d'une molécule d'adénine entourée de molécules d'uracile. Pour ces deux tailles, les agrégats ne contenant que la molécule d'adénine et les agrégats formés d'une seule molécule d'uracile associée à plusieurs adénines ne sont pas observés. Ainsi, bien que l'on s'attende à observer $n + 1$ pics pour un agrégat de taille n , la distribution des agrégats observés ne semble pas statistique. L'analyse de ces résultats est néanmoins délicate, dans le sens où l'on ne connaît pas précisément la distribution initiale en taille. Il y a donc, dans ces spectres, à la fois une contribution due au processus de production des agrégats, mais aussi l'effet de l'ionisation suivie éventuellement de la fragmentation induite par les ions multichargés. Toutefois, en première approximation, il est légitime de s'attendre à ce que la distribution obtenue se rapproche d'une distribution binômiale, ce qui n'est pas le cas (absence évidente de certains pics par exemple). Une explication à cette observation peut être formulée en considérant que le phénomène observé provient de la formation initiale de paires [ura+ade] fortement liées, sur lesquelles d'autres molécules d'uracile viennent s'agréger. Ces paires stabiliseraient les agrégats et la croissance pourrait être favorisée par la formation de liaisons hydrogènes avec les molécules d'uracile.

Afin de mieux comprendre ce comportement singulier et de vérifier si les nucléobases impliquées dans les paires de Watson Crick de l'ADN (ou l'ARN) forment bel et bien, en phase gazeuse, des paires préférentielles, des expériences avec un mélange de bases nucléiques ne créant pas de paires de Watson Crick dans l'ADN (ou l'ARN) ont été réalisées. La figure 5.21 présente un spectre de masse d'agrégats mixtes de cytosine et d'adénine formés par une source d'agréation gazeuse et ionisés par des ions O⁵⁺ à 50 keV. La différence avec le spectre d'uracile et d'adénine est assez flagrante, puisque l'on constate que des espèces, qui n'apparaissaient pas dans le cas précédent, sont ici bien représentées. C'est le cas, entre autres, pour les agrégats de taille 4 de [cyt₂+ade₂] ou de [cyt₁+ade₃] et pour les agrégats de taille 5 de [cyt₃+ade₂] ou de [cyt₂+ade₃]. La distribution des agrégats obtenue est représentative des différentes possibilités statistiques de formation, dans le sens où tous les agrégats d'une taille donnée peuvent être observés (sauf lorsque leur intensité est très faible). Une explication de cette différence par rapport aux agrégats d'uracile et d'adénine peut être donnée. On peut effectivement penser que la formation des agrégats de cytosine et d'uracile est régie par des interactions de type van der Waals au lieu de liaisons hydrogènes. Ainsi la stabilisation renforcée provenant de la formation d'une paire préférentielle n'interviendrait pas dans le cas des bases ne formant pas de paires de Watson

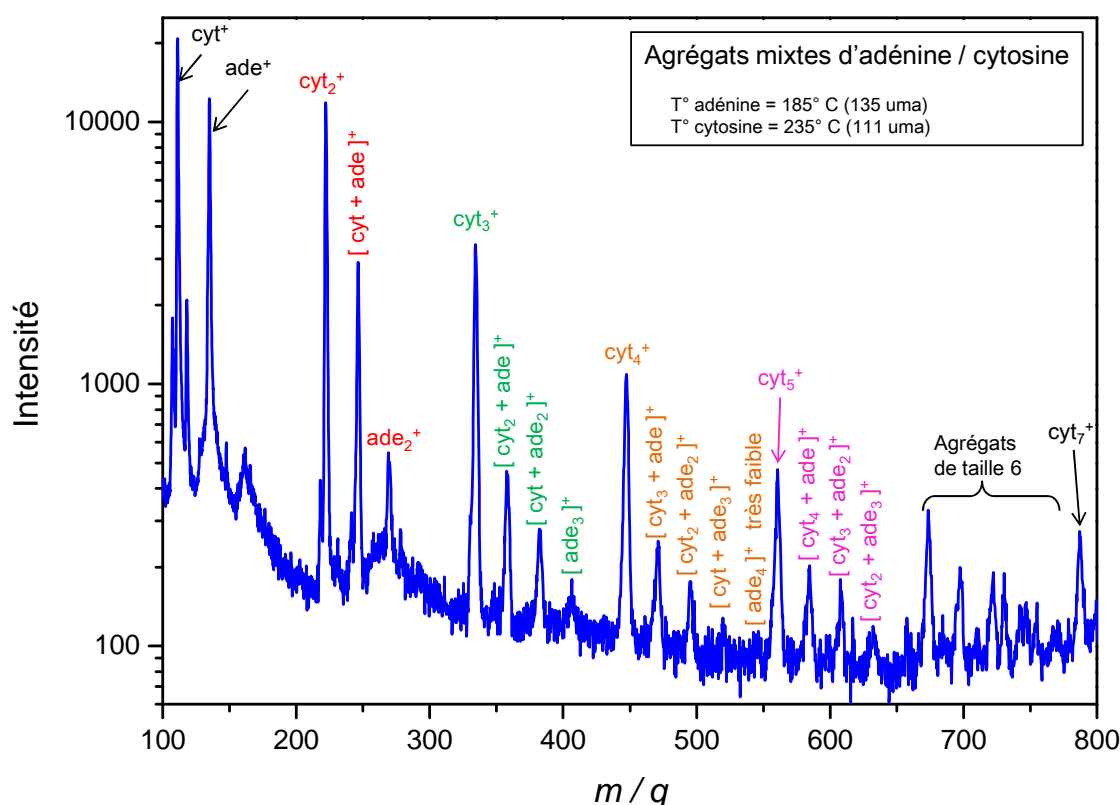


FIGURE 5.21 – Spectre de masse d'agrégats mixtes de cytosine (cyt) et d'adénine (ade) formés par une source d'agrégation gazeuse et ionisés par des ions O^{5+} à 50 keV. Ces deux acides nucléiques ne sont pas impliqués dans la formation de paires de Watson Crick dans la molécule d'ARN.

Crick dans l'ADN (ou l'ARN).

Bien que préliminaires, plusieurs conclusions importantes sur ces expériences d'agrégats mixtes peuvent être mises en avant. Dans le cas où les deux molécules (adénine et uracile) sont des bases complémentaires de l'ARN, la formation d'agrégats mixtes semble contrainte par des processus physiques liés à une certaine reconnaissance moléculaire, qui se caractérise par une abondance, dans le spectre de masse, d'agrégats contenant un cœur formé par une paire [ura+ade] sur lequel des molécules d'uracile viennent s'agréger. Ce résultat est également confirmé par d'autres spectres de masse que nous avons réalisé avec le mélange thymine / adénine (non présentés ici). À contrario, lorsque les molécules (cytosine et adénine) ne sont pas des bases complémentaires de l'ADN (ou de l'ARN), le processus d'agrégation semble alors régi essentiellement par des phénomènes statistiques, liés à l'utilisation de notre méthode par agrégation gazeuse. Enfin, en se basant sur les résultats obtenus avec les agrégats purs de thymine de la partie précédente, on peut suggérer l'idée que le processus de formation des agrégats d'uracile-adénine fait intervenir des liaisons hydrogènes, alors que les agrégats de cytosine-adénine ne feraient appel qu'à des liaisons faibles de type van der Waals.

6 Influence de la complexation sur la fragmentation de la liaison N-C_α

Sommaire

6.1 Dissociation du dipeptide alanine-lysine doublement chargé

L'ECD¹, c'est-à-dire la dissociation induite par l'attachement d'électrons libres de basse énergie, est aujourd'hui une technique très largement utilisée en spectrométrie de masse pour obtenir la séquence des acides aminés qui constitue les peptides et les protéines [113–118]. Le principal avantage de cette technique est la fragmentation sélective de la liaison N-C_α qui permet d'avoir accès au squelette de la structure peptidique étudiée. Plus précisément, la littérature montre que la capture d'un électron par des cations peptidiques en phase gazeuse conduit à trois voies de dissociation différentes [119]. Outre la cassure de la liaison N-C_α, la perte d'hydrogène ainsi que celle du groupement NH₃ entrent également en compétition. Les recherches, qui visent à comprendre les mécanismes physiques de l'ECD, sont donc particulièrement actives.

Dans les expériences que nous avons réalisées en collaboration avec l'Université d'Aarhus, nous avons recours à l'ECID², où la capture d'un électron par la biomolécule est induite lors de collisions avec un gaz alcalin. Nous avons d'ores et déjà décrit cette technique et le dispositif expérimental associé au chapitre 3 de la partie II. De façon surprenante, plusieurs études montrent que les spectres issus d'expériences d'ECID et d'ECD sont très proches [65, 66, 120]. Cette similitude est d'autant plus remarquable que ces deux techniques diffèrent de façon importante sur plusieurs aspects. Ainsi, l'échelle de temps des expériences d'ECD est de l'ordre de quelques centaines de millisecondes, alors que celle mise en oeuvre avec l'ECID est égale à quelques microsecondes. D'autre part, dans le cas de l'ECD, l'énergie de recombinaison³ (de l'ordre de 4-6 eV) est complètement absorbée par la biomolécule, tandis que dans le processus d'ECID, l'énergie d'excitation dépend de l'état électronique qui a été peuplé lors de la capture [121]. Le fait que les résultats de ces deux techniques soient comparables laisse penser que la capture électronique fait intervenir

1. ECD : *Electron Capture Dissociation*

2. ECID : *Electron Capture Induced Dissociation*

3. L'énergie de recombinaison est définie comme l'énergie qui est libérée lorsque deux espèces de charge opposées se recombinent pour former une molécule neutre. Dans le cas présent, où l'on considère la capture d'un électron par un dication, elle correspond à l'énergie libérée lors de cette attachement électronique.

des états électroniques similaires et conduit à des mécanismes de fragmentation proches. La technique d'ECID, qui est utilisée dans le groupe de Preben Hvelplund à Aarhus, permet donc de « mimer » l'ECD afin de mieux comprendre les processus qui interviennent lors de la capture d'électrons par des biomolécules et de la fragmentation qui s'en suit.

Dans ce contexte, nous nous intéressons dans ce chapitre à la fragmentation de la liaison N-C_α du dipeptide doublement chargé d'alanine-lysine (A = alanine, K = lysine). Nous utilisons la présence d'un environnement que constitue une molécule d'éther couronne (sur laquelle nous allons revenir) dans le but de contraindre les voies de fragmentation induites par la capture d'un électron. La comparaison des spectres obtenus avec le dipeptide isolé et celui solvaté permet d'apporter un éclairage nouveau sur les mécanismes qui conduisent à la dissociation.

6.1 Dissociation du dipeptide alanine-lysine doublement chargé

Nous avons étudié la fragmentation de l'espèce [AK+2H]²⁺ induite par des collisions avec un gaz de sodium. Le dispositif expérimental est similaire à celui utilisé pour la molécule de protoporphyrine IX (voir page 57), à l'exception du remplacement du gaz alcalin contenu dans la cellule de collisions.

Nous avons expliqué dans l'introduction comment la concordance des résultats obtenus avec l'ECD et l'ECID suggérait que des états électroniques similaires devaient entrer en jeu dans les deux techniques. Dans cette démarche, l'objet de ce premier travail sur le dipeptide isolé [AK+2H]²⁺ est de voir dans quelle mesure l'importance relative des voies de fragmentation principale, qui font suite à la capture d'un électron, est conditionnée par l'énergie cinétique du faisceau de biomolécules, l'énergie d'ionisation du gaz collisionnel et la coordination d'une molécule d'éther couronne. La formation d'un complexe avec cette dernière molécule permet également de voir l'influence de la présence d'un environnement sur les canaux de dissociation.

Le dipeptide AK a été choisi pour deux raisons essentiellement. D'abord, parce que s'agissant d'un dipeptide, il est suffisamment petit pour permettre de limiter les temps de calcul que nécessitent les modèles de chimie quantique. À cet égard, une structure possible du dipeptide protoné [AK+2H]²⁺ est visible sur la figure 6.1⁴. Ensuite, parce que la présence d'un deuxième groupement NH₂ sur la chaîne radicalaire de la lysine permet d'obtenir facilement un système doublement chargé par protonation. Ainsi, la capture d'un électron par le système biomoléculaire conduit à une espèce simplement chargée facilement détectable. Enfin, parce que la répulsion coulombienne entre les deux charges des ions ammonium limite la flexibilité conformationnelle et minimise le repliement de la structure, ce qui facilite l'interprétation des résultats en termes de mécanismes.

Expérimentalement, les dipeptides AK doublement protonés, de masse $m = 219$ u.m.a., sont produits grâce à une source électrospray. La solution, qui est injectée dans le dispositif, est constituée de méthanol et d'eau en proportion 1 : 1 auquel on ajoute 5% d'acide acétique

4. Le calcul de DFT est effectué avec un niveau de théorie B3LYP/6-31+G(d).

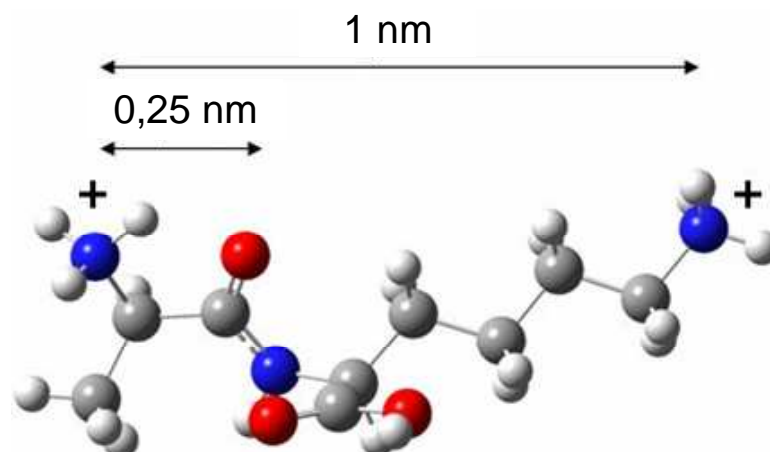


FIGURE 6.1 — Structure possible du dication $[AK+2H]^{2+}$. Les atomes d'azote sont représentés en bleu, ceux d'oxygène en rouge, les atomes de carbone en gris et les hydrogènes en blanc.

pour favoriser la protonation.

6.1.1 Spectre de fragmentation du dication $[AK+2H]^{2+}$ isolé

La figure 6.2 montre un spectre de fragmentation du dipeptide $[AK+2H]^{2+}$ obtenu lors de collisions avec la cellule de sodium. La molécule intacte est notée M^{2+} et se trouve à $m/q = 219/2 = 109,5$. On peut identifier sur cette figure les trois voies de dissociation principales qui proviennent de la capture électronique et que nous avons évoquées dans l'introduction du chapitre. La perte la plus importante est celle de l'hydrogène (pic M^+-H à $m/q = 218$) suivie de celle de NH_3 (pic M^+-NH_3 à $m/q = 202$). On constate également la cassure de la liaison $N-C_\alpha$ qui conduit à la formation des espèces c^+ et z^+ illustrées sur la figure 6.2. Les autres pics, de moindre importance et présents sur le spectre, sont attribués à la dissociation induite par la collision (CID). Ceci peut être vérifié en utilisant de l'hélium ou du néon comme gaz dans la cellule de collisions, puisque seuls les processus de CID restent actifs.

Nous avons complété cette mesure par une étude de l'influence de différents paramètres du dispositif expérimental sur les voies de fragmentation. L'idée est effectivement de voir si les canaux de dissociation changent en fonction de la tension d'accélération du faisceau de biomolécules ou de l'énergie d'ionisation du gaz de la cellule de collisions. Si tel est le cas, on pourra alors en déduire que les états électroniques peuplés lors de captures électroniques varient avec ces paramètres.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer comment l'intensité de chacune des voies de fragmentation principales dépendait de l'énergie cinétique du faisceau de biomolécules $[AK+2H]^{2+}$. Nous avons calculé la probabilité relative de perte de H, $P(-H)$, en divisant l'intensité du pic M^+-H par l'intensité totale des ions qui proviennent de la capture électronique. Nous avons procédé de façon similaire pour la détermination des probabilités de perte relative de NH_3 , $P(-NH_3)$ et pour la probabilité de formation des espèces c^+ et z^+ , $P(c^+)$ et $P(z^+)$. Ce travail a été réalisé pour quatre tensions d'accélération

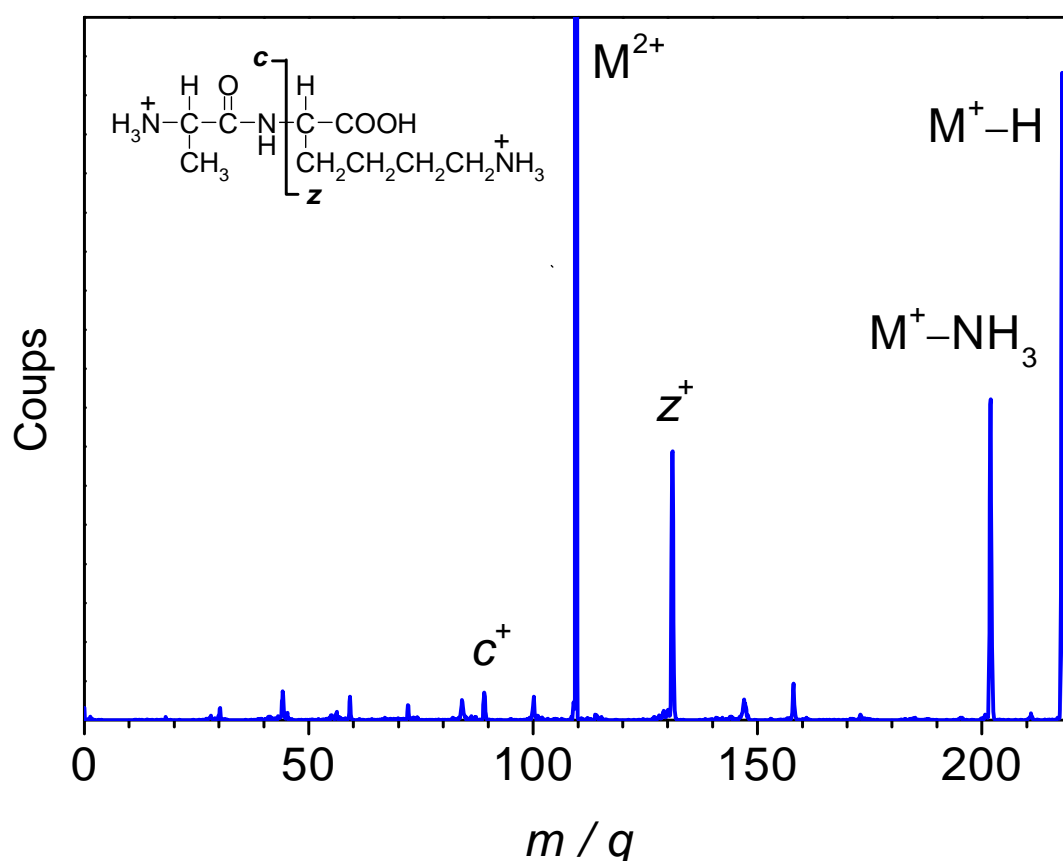


FIGURE 6.2 – Spectre de fragmentation de l'espèce $[AK+2H]^{2+}$ (notée M^{2+}) obtenu après collisions avec des atomes de sodium.

différentes, à savoir : 10, 20, 50 et 70 kV. La probabilité de formation des différents fragments suite à la capture d'un électron du sodium et en fonction de la tension d'accélération en sortie de source électrospray est présentée sur la figure 6.3.

La probabilité de formation des espèces c^+ et z^+ est quasiment constante ($P(c^+) = 0,03$ et $P(z^+) = 0,3$) et on peut donc la considérer comme indépendante de la tension d'accélération. Il n'en est pas de même avec les espèces M^+-H et M^+-NH_3 . En effet, comme le montre l'évolution du trait noir de la figure 6.3, la probabilité de perte de H est égale à environ 0,5 pour les tensions d'accélération de 10 et 20 kV ; mais elle diminue à 0,4 pour les deux tensions d'accélération plus importantes (50 et 70 kV). Dans le même temps, la probabilité de perte de NH_3 évolue dans le sens opposé. En effet, comme le montre l'allure générale de la courbe bleue, la diminution de la perte d'hydrogène est accompagnée de l'augmentation de celle de NH_3 (on passe de $P(-NH_3) = 0,2$ pour des tensions d'accélération de 10 et 20 kV à $P(-NH_3) = 0,3$ pour les deux valeurs supérieures de tension). Cette compétition entre les deux voies de fragmentation met en évidence le fait que l'état électronique, qui est peuplé lors du transfert de l'électron du sodium à la biomolécule, dépend de la tension d'accélération. La vitesse de collision semble ainsi modifier le rapport de branchement entre les deux voies dissociatives. On peut penser que lorsque l'énergie cinétique du faisceau augmente, l'énergie d'excitation augmente également. Ainsi,

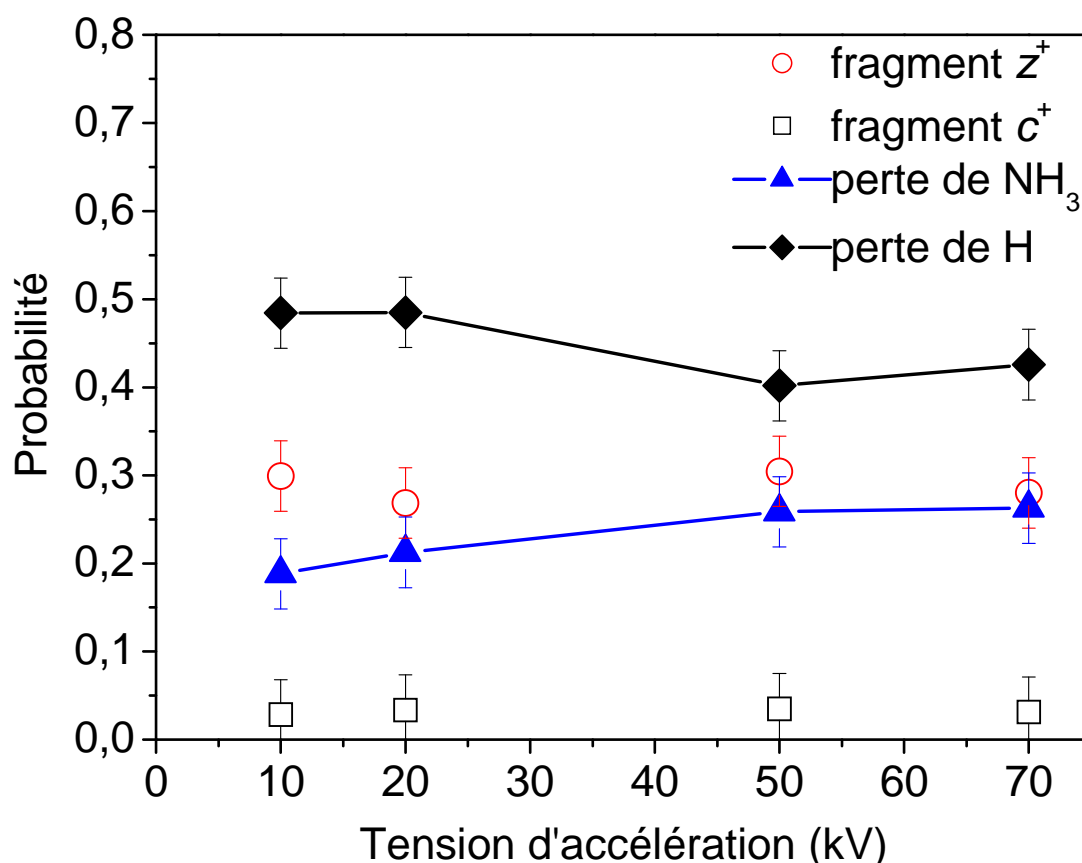


FIGURE 6.3 – Probabilité de formation des fragments M^+-H , M^+-NH_3 , c^+ et z^+ suite à la capture d'un électron du sodium en fonction de la tension d'accélération du faisceau de biomolécules $[AK+2H]^{2+}$.

de petits changements dans l'énergie d'excitation induisent des processus de fragmentation différents. L'expérience montre que l'accroissement de l'énergie d'excitation conduit à une perte de NH_3 plus importante. Une autre explication peut également être formulée, si l'on garde à l'esprit qu'un nombre important de conformères est présent dans le faisceau de biomolécules. La perte plus importante de NH_3 pourrait alors provenir du fait que certains conformères sont « privilégiés » ou tout au moins plus exposés dans les collisions à plus hautes vitesses.

Nous avons enfin réalisé des expériences avec différents gaz afin de voir l'influence de l'énergie d'ionisation du gaz sur la répartition des quatre canaux de fragmentation principaux. Nous avons utilisé les gaz Cs, Na, NO, Xe et Kr. La figure 6.4 montre l'évolution de la probabilité de formation des espèces M^+-H , M^+-NH_3 , c^+ et z^+ après capture électronique dans ces différents gaz. On constate que la probabilité de formation de c^+ et z^+ est indépendante du gaz considéré, comme elle l'était déjà pour la tension d'accélération. Ainsi, la probabilité de cassure de la liaison $N-C_\alpha$ ne dépend ni de l'énergie cinétique du faisceau de biomolécules, ni de l'énergie d'ionisation du gaz de la collision, alors même que la différence entre les énergies d'ionisation peut atteindre 10 eV. En ce qui concerne la perte d'hydrogène et de NH_3 , on remarque une différence importante suivant que l'on

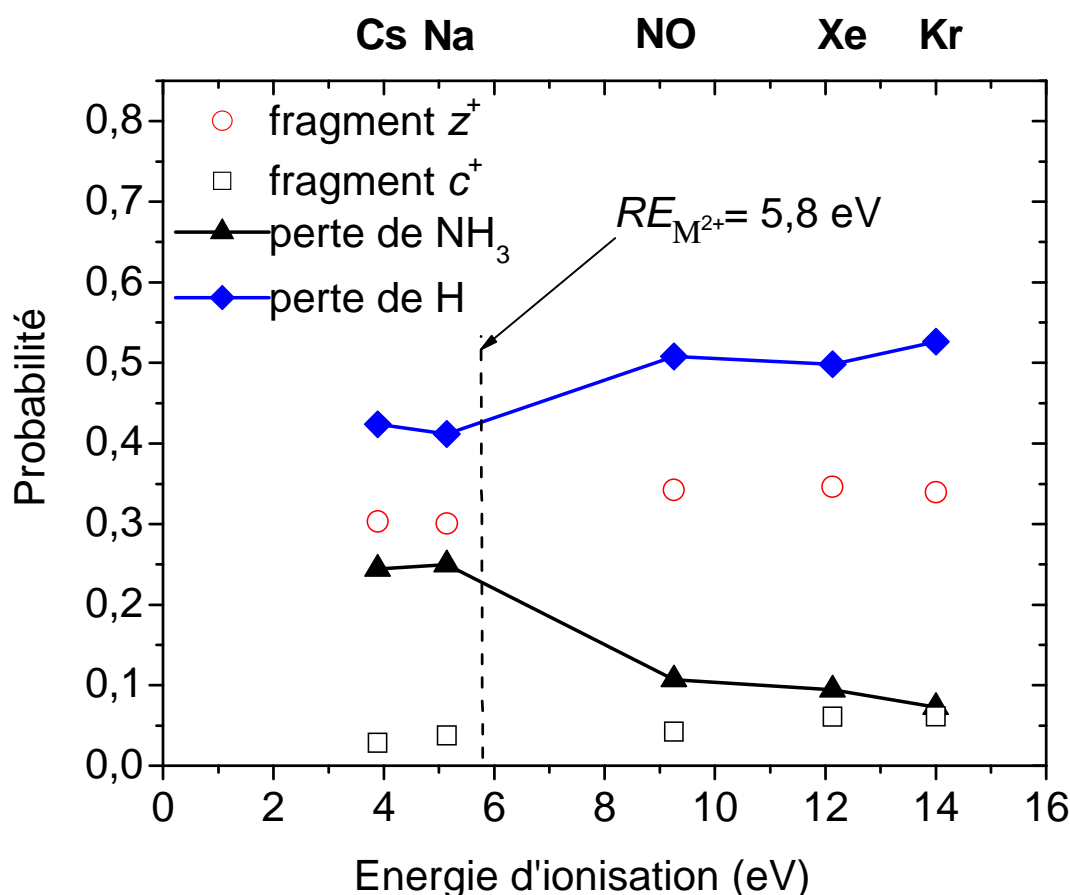


FIGURE 6.4 – Probabilité de formation des fragments M^+-H , M^+-NH_3 , c^+ et z^+ suite à la capture d'un électron du sodium en fonction de l'énergie d'ionisation de différents gaz de la cellule de collisions. La ligne en pointillés indique la valeur calculée de l'énergie de recombinaison de l'espèce M^{2+} (5,8 eV).

considère les gaz Cs et Na, d'un côté, ou NO, Xe, Kr, de l'autre. En effet, la probabilité de perte d'un hydrogène passe de $P(-H) = 0,4$ pour les gaz alcalins, à $P(-H) = 0,5$ pour les gaz du deuxième groupe. De façon contraire, la probabilité de perte de NH_3 , diminue fortement lorsqu'on passe d'un groupe de gaz à l'autre ($P(-NH_3) = 0,25$ pour Cs et Na puis chute à une valeur moyenne de 0,09 pour NO, Xe, Kr). L'équipe d'Aarhus a calculé⁵ une énergie de recombinaison électronique du dication $[AK+2H]^{2+}$ égale à 5,8 eV (trait en pointillés sur la figure 6.4). Cette valeur se situe entre les énergies d'ionisation des deux groupes de gaz que nous venons d'évoquer. Comme l'énergie de recombinaison est supérieure à celle d'ionisation pour les gaz Cs et Na, la capture électronique est exothermique pour les gaz alcalins, alors qu'elle est endothermique pour les gaz du second groupe (NO, Xe, Kr). Afin de mieux comprendre le mécanisme mis en jeu dans une telle réaction, un diagramme schématisant des courbes d'énergies électroniques qui interagissent est présentée sur la figure 6.5. Pour cela, nous considérons le cas d'une réaction du type : $A^{2+} + B \rightarrow A^+ + B^+$, où A est un ion doublement chargé (représentant une biomolécule) et B une atome neutre. Lorsque l'ion A^{2+} passe au voisinage de B , la particule chargée va

5. Calcul de DFT au niveau de théorie B3LYP/6-311++G(2d,p)//B3LYP/6-31+G(d).

déformer le nuage électronique de l'atome B . Ainsi, la voie d'entrée $A^{2+} + B$ est légèrement attractive à grande distance internucléaire à cause de l'interaction de polarisation et elle devient fortement répulsive lorsque la distance entre les particules (R) est faible. L'énergie électronique qui caractérise l'attraction à grande distance est proportionnelle à R^{-4} , alors que la répulsion à courte distance est en R^{-n} , où n est un nombre qui peut être très grand (supérieur à 6). La voie de sortie $A^+ + B^+$, quant à elle, est fortement répulsive à cause de l'interaction coulombienne qui est proportionnelle à R^{-1} (courbes bleues et violette). Dans le cas d'une réaction exothermique (courbes bleues), un couplage fort intervient au niveau des croisements des courbes de potentiel (en rouge) et conduit au transfert de l'électron. Suivant la probabilité de transition des différentes zones de croisement, l'électron a la possibilité de peupler un état électronique excité (courbe bleue en pointillés). Pour une réaction endothermique (courbe violette), l'énergie supplémentaire nécessaire à la réalisation de la réaction provient de l'énergie cinétique du faisceau A^{2+} . Cette réaction n'étant énergétiquement pas favorable (en particulier à basse énergie de collision), l'électron est alors transféré de façon préférentielle dans l'état électronique fondamental (ou un état très proche). Ainsi, lors d'une réaction exothermique, la probabilité que l'électron transféré soit dans un état électronique excité du système est plus importante que dans le cas d'une réaction endothermique.

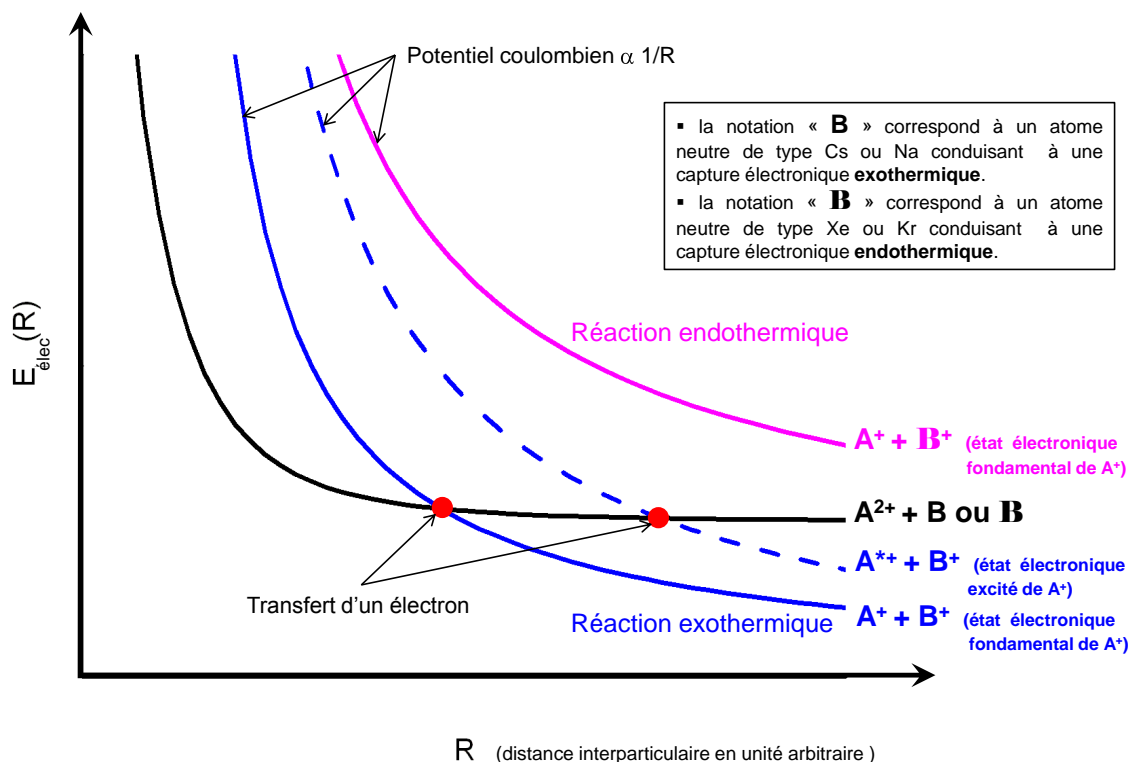


FIGURE 6.5 – Diagramme schématisant des courbes de potentiel intervenant dans la réaction de transfert électronique : $A^{2+} + B \rightarrow A^+ + B^+$.

Les résultats expérimentaux montrent que la perte d'hydrogène est favorisée dans le cas de collisions avec des gaz possédant une énergie d'ionisation élevée, c'est-à-dire dans le cas d'une réaction endothermique. Nous venons de montrer que dans ce type de réaction,

l'énergie d'excitation est moindre (transfert préférentiel de l'électron dans l'état fondamental). En conséquence, une diminution de l'énergie d'excitation du système conduit à une perte plus importante d'hydrogène, ce qui est en accord avec la conclusion établie pour l'expérience avec la tension d'accélération. De façon similaire, on peut également penser que la capture électronique avec des gaz possédant une énergie d'ionisation importante intervient, de façon dominante, pour des conformations du dipeptide qui possèdent une plus forte énergie de recombinaison électronique.

La synthèse de ces résultats montre que le mécanisme de capture électronique et la fragmentation, qui conduit aux espèces c^+ et z^+ , sont indépendants de la tension d'accélération et du gaz utilisé. L'énergie d'excitation du système a donc peu d'influence sur leur formation. À l'inverse, les changements dans le ratio de perte de H et de NH_3 semblent montrer que les processus de capture et de dissociation pour ces deux canaux sont différents de ceux impliqués dans la formation de c^+ et z^+ . En particulier, une dépendance entre l'augmentation de l'énergie d'excitation et la perte de NH_3 a été mise en évidence. Il semble donc que la capture de l'électron puisse se produire sur deux sites différents du dipeptide, l'un peu sensible à l'énergie d'excitation et conduisant aux espèces c^+ et z^+ , tandis que l'autre (perte de H et de NH_3) dépend de façon plus évidente de l'énergie cinétique du faisceau et de l'énergie d'ionisation du gaz utilisé. Pour préciser ceci, nous avons cherché à voir l'effet d'un environnement particulier sur les processus de dissociation du dipeptide $[AK+2H]^{2+}$.

6.1.2 Étude du dication $[AK+2H]^{2+}$ complexé par une molécule d'éther couronne

Les molécules d'éther couronne⁶ sont connues pour leur capacité à fortement solvater les cations. Il s'agit de composés chimiques hétérocycliques, dont l'unité de répétition est le groupe éthylénoxy-, CH_2CH_2O . La molécule que nous avons utilisée est nommée 18-couronne-6 (abrégée dans la suite en CE pour *Crown Ether*), car la molécule comporte 18 atomes dans le cycle (sans compter les hydrogènes) dont 6 atomes d'oxygène ($C_{12}H_{24}O_6$ de masse 264 u.m.a.). La figure 6.6 est une représentation de la molécule utilisée dans cette expérience.

Dans cette molécule, les atomes d'oxygène sont placés de façon à se coordonner avec un cation à l'intérieur du cycle. Ainsi, les éthers couronnes vont pouvoir former un complexe avec le dipeptide $[AK+2H]^{2+}$ en se liant aux groupes NH_3^+ . La présence de CE dans la formation du complexe a trois effets chimiques importants. Elle interdit tout transfert interne de proton ou d'hydrogène provenant du groupement ammonium solvaté, elle réduit la probabilité de formation d'une liaison hydrogène interne entre le groupe ammonium (NH_3^+) et le groupe amide (OCN) ou l'acide carboxylique (COOH) et elle réduit l'énergie de recombinaison électronique liée à la capture de l'électron.

En pratique, la production de complexes non covalents de dipeptide-éther couronne est

6. Les éthers couronnes sont synthétisés pour la première fois en 1967 par Charles Pedersen, chimiste chez DuPont. Il reçoit le Prix Nobel de Chimie vingt ans plus tard pour la découverte des voies de synthèse et des propriétés liantes de ces molécules, travaux qui ont largement contribué au développement de la chimie supramoléculaire.

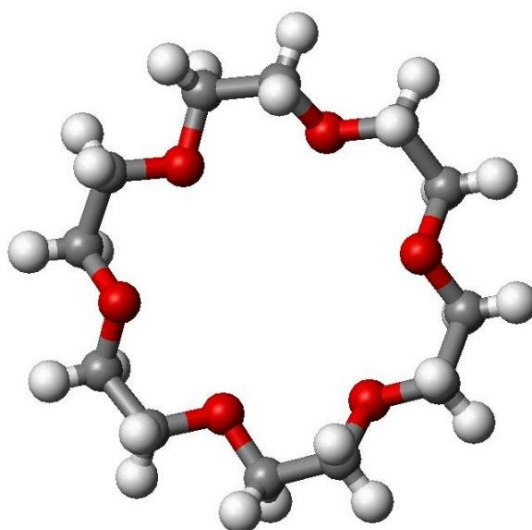


FIGURE 6.6 — Schéma de la molécule d'éther couronne (18-couronne-6) utilisée dans les expériences de complexation de peptides.

simple puisqu'il suffit d'ajouter la poudre de molécules d'éther couronne dans la solution de méthanol et d'eau. Toutefois, il faut prendre soin de minimiser l'apport en acide acétique, parce que ce réactif a tendance à dénaturer la molécule de CE.

Nous avons réalisé une première expérience en sélectionnant à l'aide de l'aimant un faisceau de biomolécules $M^{2+}(CE)$ ($m/q = 241,5$), c'est-à-dire un dipeptide $[AK+2H]^{2+}$ auquel une seule molécule d'éther couronne est attachée. Le spectre A de la figure 6.7 montre la dissociation induite par capture électronique qui résulte de la collision du faisceau de biomolécules à 100 keV d'énergie cinétique avec le sodium. On peut remarquer que l'intensité du pic $z^+(CE)$ est bien plus importante que celle du pic de z^+ dans le cas du dipeptide isolé M^{2+} (voir figure 6.7-A). Cela indique que la molécule d'éther couronne se fixe préférentiellement sur le groupe NH_3^+ de la chaîne radicalaire de la lysine. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés par Julian et Beauchamp à Caltech [122] qui ont proposé, pour la première fois en 2001, de produire en phase gazeuse des complexes peptide-éther couronne par la technique d'électrospray. On constate aussi qu'une partie importante des ions ont émis un hydrogène sans que cela nécessite la perte de CE (pic $M^+(CE)-H$). Ces hydrogènes proviennent donc de la partie N-terminal. Cette voie de fragmentation est, à nouveau, en compétition avec la perte d'ammoniac, puisque l'on observe également le pic $M^+(CE)-NH_3$. La présence de cette espèce, qui n'a pas perdu la molécule d'éther couronne, prouve que la perte d'ammoniac, observée dans ce spectre, provient uniquement de l'alanine. De façon plus générale, il a été montré récemment que la perte de NH_3 , même sans intervention de CE, provenait presque exclusivement de l'alanine et non de la lysine. Ceci a été mis en évidence de façon univoque en utilisant un marquage avec l'isotope 15 de l'azote fixé à la partie N-terminal [67]. Quant à l'hydrogène, l'origine de sa perte dans le cas du dipeptide isolé est plus difficile à préciser à cause de la présence d'un pic M^+-H qui signe à la fois la perte d'éther couronne et d'hydrogène. On ne peut donc pas conclure que la perte d'hydrogène provient uniquement de la partie N-terminal. Ce premier résultat

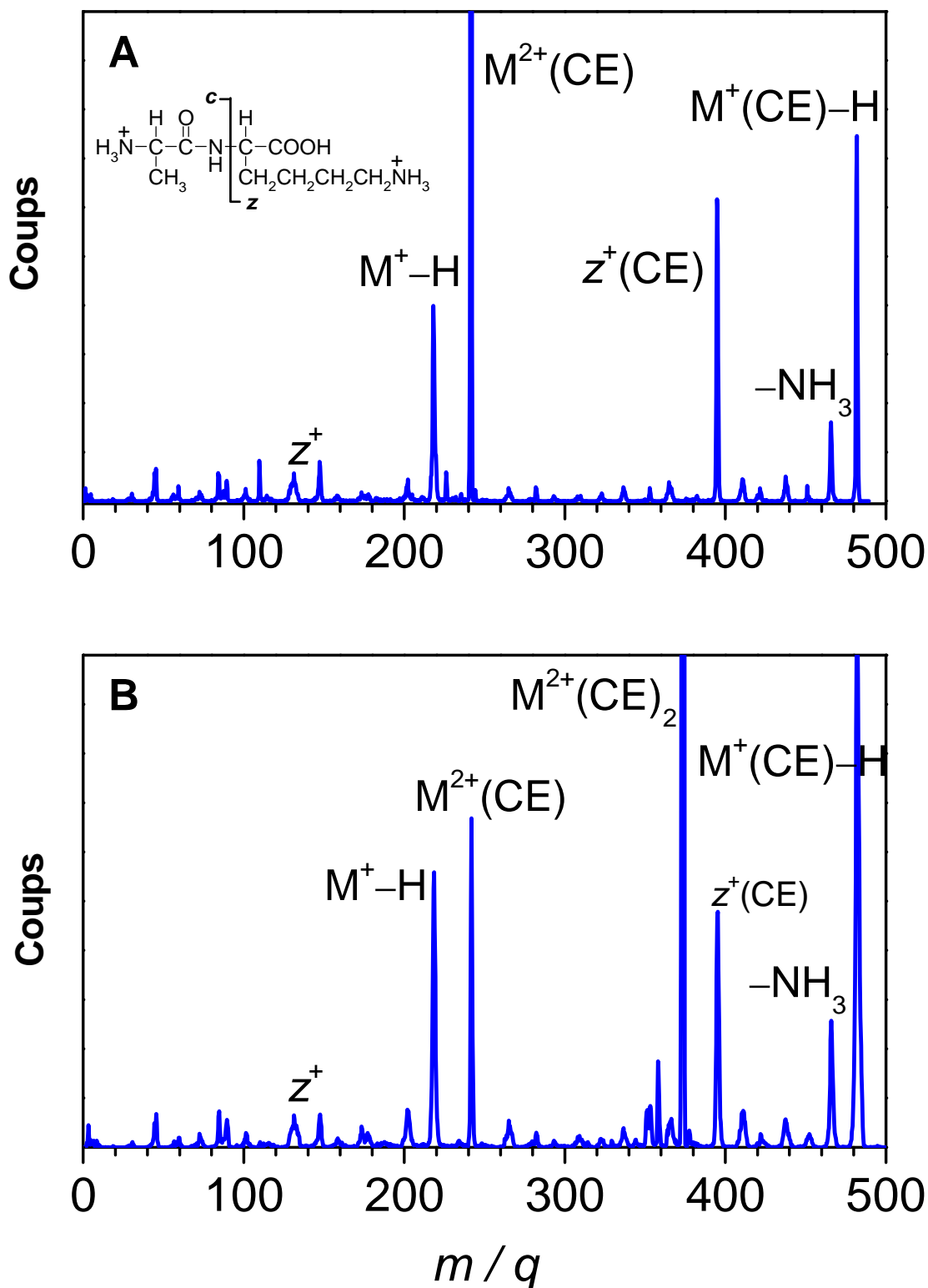


FIGURE 6.7 — Spectre de fragmentation issu de la collision d'un faisceau de $M^{2+}(CE)$ (cas A) ou de $M^{2+}(CE)_2$ (cas B) à une énergie cinétique de 100 keV avec des atomes de sodium. M^{2+} représente le dication peptidique $[AK+2H]^{2+}$.

met donc en évidence le fait que l'éther couronne se fixe sur le groupe ammonium de la lysine. La capture électronique qui a lieu au niveau de la partie N-terminal conduit à la fois à la perte d'ammoniac et à celle d'hydrogène.

Dans la partie précédente, nous avons évoqué le fait que la capture de l'électron devait se produire sur deux sites différents du dipeptide, afin d'expliquer la différence de comportement entre la formation de c^+ et z^+ , d'une part, et la perte de H et de NH_3 , d'autre part. Pour confirmer cela, nous avons procédé à la réalisation de l'expérience en sélectionnant un faisceau de $M^{2+}(CE)_2$. En effet, le mécanisme, communément admis, de dissociation qui conduit aux espèces c^+ et z^+ dans le cas de l'ECD suppose que la capture de l'électron a lieu au niveau d'un groupe ammonium et qu'un transfert de proton intramoléculaire jusqu'à l'amide (OCN) conduit à la cassure de la liaison $N-C_\alpha$ (permettant la formation de c^+ ou de z^+). Si l'on attache deux molécules d'éther couronne aux groupes NH_3^+ de l'alanine et de la lysine, il est alors possible de bloquer complètement le transfert protonique. Si le mécanisme est adapté à la description de la fragmentation de ce dipeptide, nous ne devrions pas observer la formation des espèces z^+ et $z^+(CE)$. Le spectre B de la figure 6.7 révèle que ces canaux de dissociation existent toujours dans le cas où deux éthers couronnes solvant le dipeptide $[AK+2H]^{2+}$. Ainsi la coordination de molécules d'éther couronne n'empêche pas la cassure de la liaison $N-C_\alpha$. Le transfert d'un proton en direction de l'amide n'est donc pas requis pour que cette dissociation se produise. Il est donc probable que la capture de l'électron du sodium se fasse directement au niveau de l'amide (OCN). Dans le cadre de modèles de peptides simplement chargés, Simons et coll. [123] ont prédit qu'une capture directe au niveau de l'amide devait intervenir avec une probabilité 100 fois moins grande que la capture par le groupement NH_3^+ . Ce résultat est probablement sous-estimé dans le cas de peptides doublement chargés, dans lesquels la charge supplémentaire est stabilisée au niveau de l'amide grâce à l'interaction coulombienne (orbitale π^*). Enfin, on peut aussi remarquer que la capture d'un électron par l'espèce $M^{2+}(CE)_2$ conduit toujours à la perte d'au moins une molécule d'éther couronne.

Pour compléter ces études sur l'influence de la complexation sur la dissociation, nous avons évalué la probabilité de formation des quatre fragments caractéristiques en fonction du nombre de molécules d'éther couronne attachées (voir figure 6.8).

La probabilité de formation de l'espèce z^+ augmente lorsque l'on passe du dipeptide isolé au complexe comportant un CE, puis diminue avec l'ajout d'une seconde molécule d'éther couronne. La production de z^+ est donc maximale pour un complexe formé avec une seule molécule de CE attachée à la lysine. La formation du fragment c^+ augmente légèrement avec l'attachement d'un nombre croissant de CE. Néanmoins, la contribution de cette espèce au spectre total de fragmentation est très faible. L'évolution de la formation de ces deux fragments n'est à ce jour pas bien comprise. Par contre, il est intéressant de noter que l'addition d'éther couronne provoque une augmentation de la perte d'hydrogène, alors qu'elle conduit à une diminution de la perte de NH_3 . Comme nous l'avons précisé, la coordination de molécules d'éther couronne abaisse l'énergie de recombinaison électronique du système. On peut donc penser que l'énergie d'excitation diminue avec le nombre de

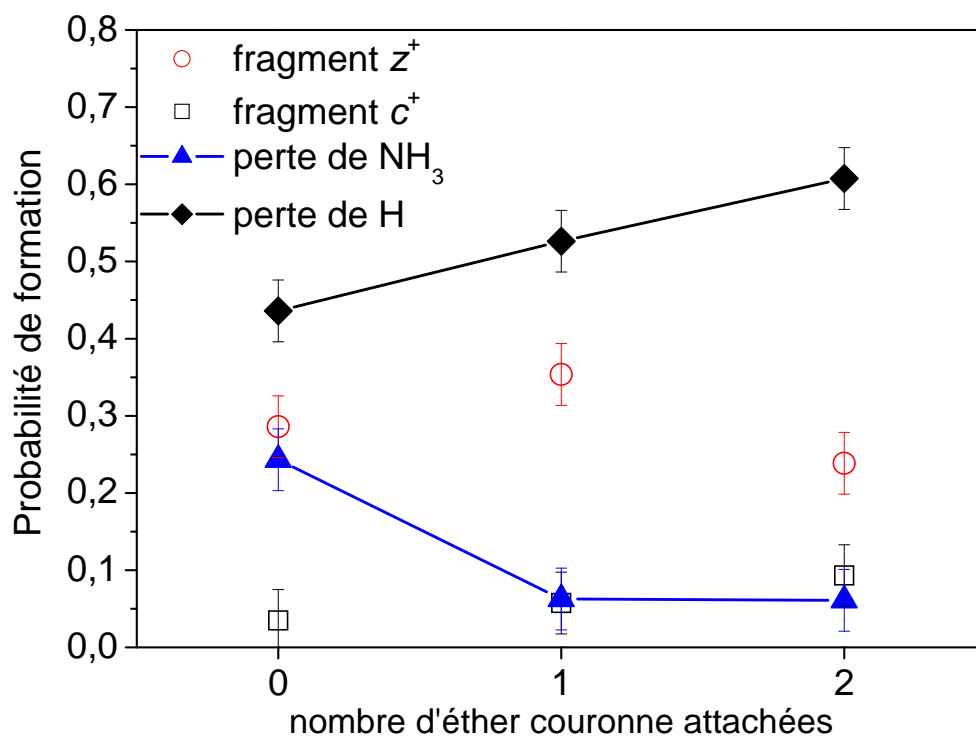


FIGURE 6.8 – Probabilité de formation des quatre fragments M^+-H , M^+-NH_3 , c^+ et z^+ suite à la capture d'un électron du sodium en fonction du nombre de molécules d'éther couronne attachées à $M^{2+}=[AK+2H]^2+$.

molécules d'éther couronne. L'expérience met en évidence le fait que lorsque l'énergie d'excitation diminue, c'est la perte d'hydrogène qui devient la voie de fragmentation la plus favorable. Ce résultat est à nouveau en accord avec les conclusions établies pour la tension d'accélération et l'énergie d'ionisation du gaz. Cependant, il convient de préciser que l'accroissement du nombre de molécules d'éther couronne forme des systèmes de masses plus importantes. Comme la tension d'accélération est constante, cela signifie que la vitesse des complexes chargés est plus petite que celle du dipeptide isolée, ce qui favorise également la perte d'hydrogène.

7

Effets de la nano-solvatation

Sommaire

7.1 Étude du dipeptide $[GA+H]^+$

7.2 Étude du tripeptide $[AAA+H]^+$

L'expérience présentée dans ce chapitre s'inscrit dans la continuité de la démarche qui consiste à comprendre les effets d'un environnement sur les voies de fragmentation de systèmes biologiques soumis à une excitation électronique. L'une des approches, qui a été décrite dans le chapitre 5 de cette partie, est de modéliser l'environnement par la présence d'autres molécules biologiques entourant la biomolécule d'intérêt. En particulier, nous avons mis en évidence très clairement l'apparition de nouveaux canaux de dissociation qui ne sont pas présents dans le cas de la biomolécule isolée. La présence d'autres biomolécules dans l'entourage de la molécule étudiée modifie ainsi la réponse du système à une excitation électronique induite par la collision.

Une autre voie d'exploration est la prise en compte de la nano-solvatation, qui est l'objet de ce chapitre. Par ce terme, nous entendons des systèmes d'intérêt biologique sur lesquels sont attachées une ou plusieurs molécules de solvant. Dans la continuité des travaux présentés dans le chapitre 6, nous nous intéressons ici à la fragmentation induite par collision et capture électroniques de di- et tri-peptides monochargés et nano-solvatés. Nous utilisons pour cela la technique d'ECID précédemment décrite, dans laquelle un faisceau de biomolécules entre en collision avec un gaz de césium. S'agissant de monocations de dipeptides, la capture d'un électron de valence du césium va conduire à la formation d'une espèce neutre qui ne pourra pas être détectée. Ainsi, nous avons à nouveau eu recours à la technique NRMS (*Neutralization Reionization Mass Spectrometry*), inventée par F. W. MacLafferty à la fin des années 80 [124, 125], utilisée pour la molécule de protoporphyrine (chapitre 3 de la partie II). Il s'agit d'une expérience dite de « charge opposée », où l'on augmente la pression de vapeur de césium dans la cellule, de façon à obtenir une forte probabilité de capturer deux électrons lors de deux collisions successives. Ainsi partant d'un di- ou tri-peptide monochargé, on obtient une espèce chargée négativement qui est facilement détectable.

7.1 Étude du dipeptide $[GA+H]^+$

Le dispositif expérimental utilisé pour cette expérience a été décrit précédemment (voir chapitre 3, page 57). Les peptides ont été dissous dans une solution d'eau et de méthanol (en proportion 1 : 1) à laquelle 5% d'acide acétique ont été ajoutés. Les espèces chargées sont produites en phase gazeuse grâce à la technique d'ionisation par electrospray (voir chapitre 8, page 145).

7.1.1 Effets de l'hydratation

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au dipeptide protoné $[GA+H]^+$ (G = glycine et A = alanine) non solvate. Afin de mettre en évidence la dissociation de la molécule induite par la collision (CID) avec le césium, l'analyseur a été réglé de façon à détecter les espèces positivement chargées. Le spectre obtenu dans cette configuration est visible en haut de la figure 7.1. Le pic le plus intense correspond au dipeptide intact de rapport $m/q = 147$. Les autres fragments aisément identifiables sur ce spectre proviennent de la cassure du squelette de la molécule. Les fragments sont annotés selon la nomenclature usuelle [126] détaillée sur la figure 7.2. On distingue ainsi clairement les dissociations donnant lieu à la création de a^+ , b^+ et y^+ , mais aussi celles provenant des parties N- et C-terminal du dipeptide avec l'apparition de $[GA+H-NH_3]^+$ et de CO_2^+ . L'espèce $[GA+H-CO_2H]^+$ est également observée.

En effectuant une analyse en masse des fragments négatifs, on obtient le spectre de « charge opposée » du dipeptide. Il est présenté sur la figure 7.1 (deuxième spectre en partant du haut). Les fragments de ce spectre proviennent du dipeptide, initialement chargé une fois positivement, qui a capturé deux électrons lors de deux collisions avec les atomes de césium et qui devient alors négativement chargé. Le spectre ne laisse apparaître que trois fragments majoritaires (z^- , y^- et la perte de NH_3). Le fragment majoritaire est l'espèce y^- ($m/q = 88$). Nous proposons dans la suite un processus en deux étapes expliquant la formation de ce fragment sur la base des mécanismes connus de fragmentation des peptides induite par capture électronique. Le second fragment le plus intense du spectre est l'anion z^- ($m/q = 73$). Le mécanisme, largement admis [127], de formation de cette espèce est présentée sur le schéma de la figure 7.3. Lors d'une première collision avec le césium, la capture d'un électron conduit à la cassure de la liaison $N-C_\alpha$ (discutée dans le chapitre précédent) et à la création d'un radical z^\bullet et de l'espèce neutre c . Une seconde collision avec le césium permet au fragment z de capturer un électron, expliquant la création de l'anion z^- . Notons qu'il est également possible qu'un électron soit capturé par le fragment c , fragment issu de la première collision, donnant lieu à un anion c^- . Néanmoins, il a été montré que le temps de vie de cette espèce n'est pas compatible avec l'échelle de temps de l'expérience (quelques μs) [127]. Dans le chapitre précédent, nous avons également mis en évidence le fait que la capture d'un électron au niveau de la région N-terminal conduit à la perte de NH_3 . Le pic, qui est clairement identifié sur le spectre ($m/q = 130$), peut donc être expliqué simplement par le second mécanisme de la figure 7.3. On observe également

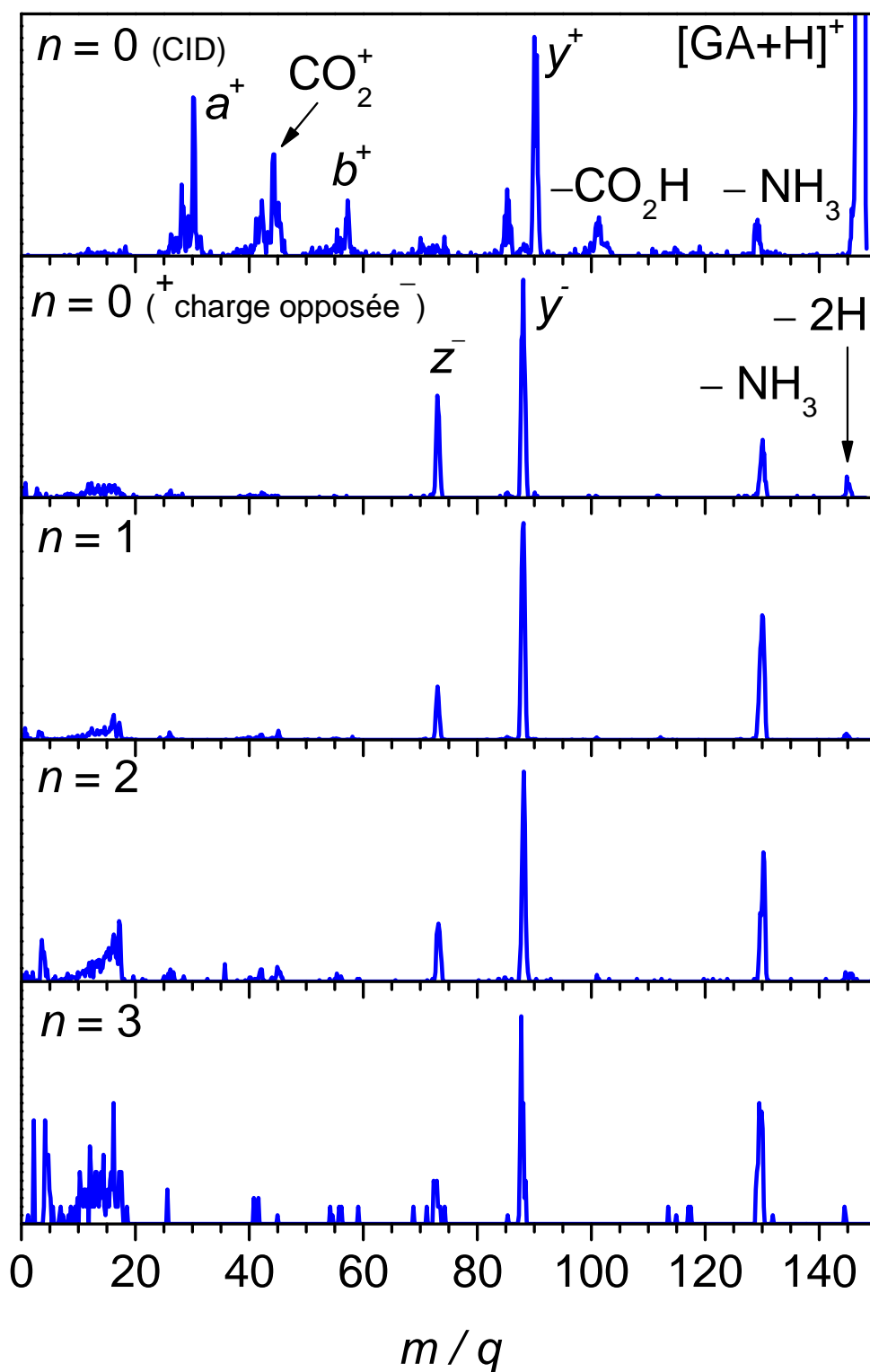


FIGURE 7.1 — Spectres de fragmentation issus de la collision entre le dipeptide hydraté $[\text{GA}+\text{H}]^+(\text{H}_2\text{O})_n$ et des atomes de césium. Le spectre du haut, pour $n = 0$, correspond aux fragments positifs détectés qui proviennent de la dissociation induite par la collision. En dessous, les quatre spectres de « charge opposée » ($n = 0, 1, 2, 3$) mettent en évidence les fragments négatifs provenant du dipeptide hydraté.

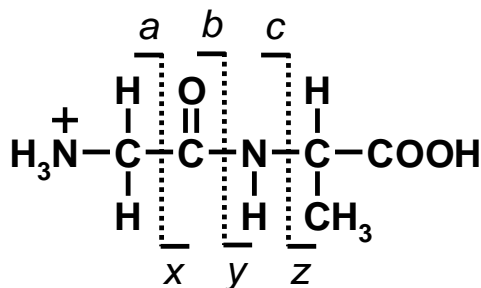


FIGURE 7.2 – Nomenclature usuelle de la fragmentation du squelette du dipeptide $[GA+H]^+$.

la perte de deux atomes d'hydrogène par le dipeptide $[GA+H]^+$ sur le spectre de « charge opposée ». On peut penser que la capture d'un électron provoque l'émission d'un atome d'hydrogène. Ainsi, une capture électronique double faisant suite à deux collisions peut conduire à la perte de deux hydrogènes consécutivement.

Enfin, le fragment y^- ($m/q = 88$) est produit par la cassure de la liaison amide qui n'est pas observée lors de la capture d'un électron par un peptide positivement chargé. Par conséquent, la formation de cette espèce peut s'expliquer par un processus en deux étapes dans lequel interviendrait une première collision sans transfert d'électron conduisant à la formation de b^+ et de y neutre. Cette première étape serait suivie d'une capture électronique par l'espèce y , lors d'une seconde collision permettant ainsi la création de y^- . L'observation en proportion notable du fragment b^+ dans le spectre de CID semble confirmer la première étape de cette hypothèse. Ainsi, l'espèce y^- serait créée suite à une dissociation induite par la collision (contrairement à la première étape de création de z^- , qui est une capture électronique), suivie d'une capture électronique lors d'une deuxième collision avec le césium.

L'analyse des fragments du dipeptide isolé est l'occasion de préciser quelques remarques physiques importantes sur cette expérience. Même s'il est clair que le processus le plus probable dans cette expérience est la capture de deux électrons lors de deux collisions, il n'est pas possible de s'assurer qu'une partie des fragments observés sur le spectre de « charge opposée » ne provient pas de doubles captures électroniques. Par ce terme, nous entendons la capture de deux électrons (qui peut être séquentielle) lors d'une seule collision avec le césium. De plus, il est important de noter que l'expérience ne permet pas de déterminer précisément les probabilités des voies de fragmentation à cause des sections efficaces différentes des fragments neutres formés lors de la première collision avec le césium. Par contre, la méthode met en évidence les changements dans les rapports de branchements et permet ainsi de souligner les éventuelles modifications des voies de fragmentation, lors du passage de la biomolécule isolée à un système nano-solvaté.

Cette comparaison avec des espèces hydratées $[GA+H]^+(H_2O)_n$ est visible sur la figure 7.1, où les trois spectres de « charge opposée » annotés $n = 1, 2, 3$ correspondent respectivement au dipeptide entouré d'une, deux et trois molécules d'eau. La comparaison avec le spectre de « charge opposée » de la molécule isolée, situé en dessus pour $n = 0$ est aisé. On

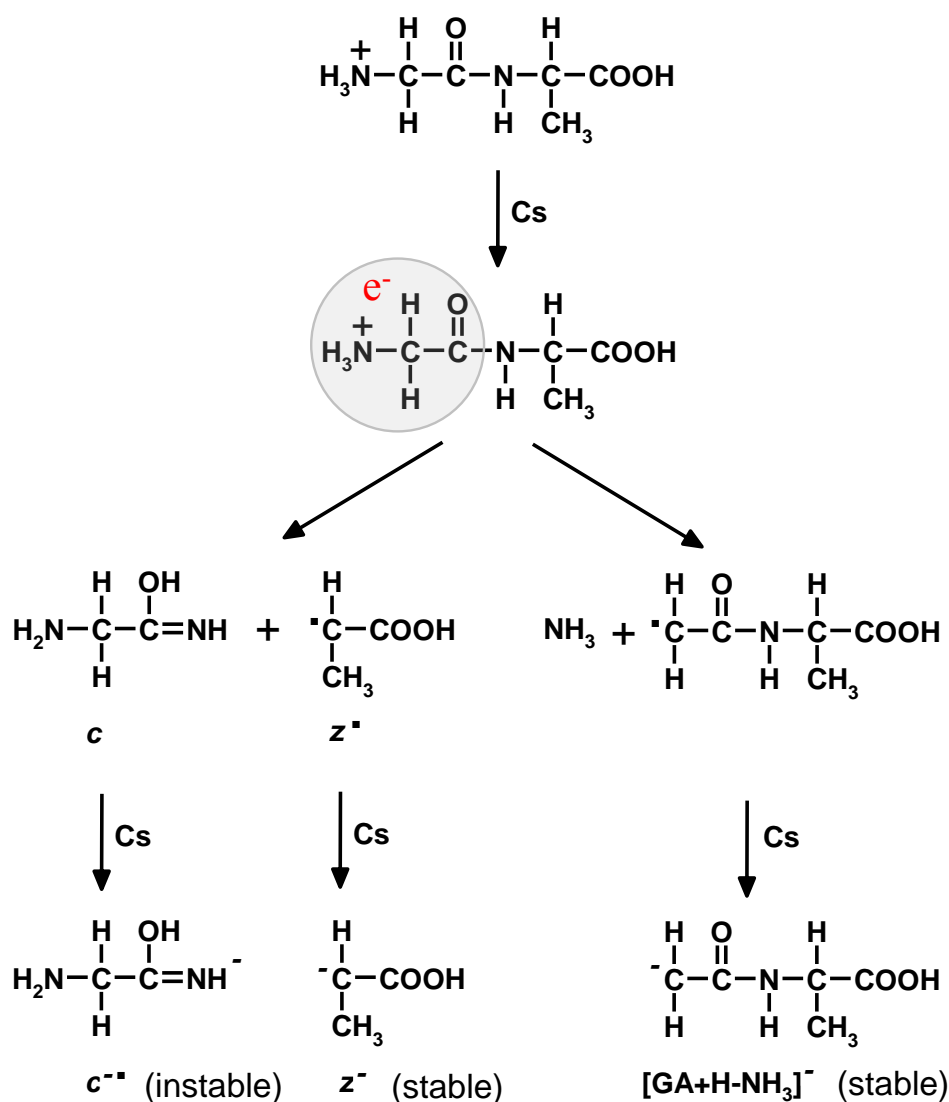


FIGURE 7.3 – La capture électronique au niveau de la région N-terminal conduit à la perte d'ammoniac (NH_3) ou à la cassure de la liaison $\text{N}-\text{C}_\alpha$.

constate ainsi que le pic de l'espèce $[\text{GA}+\text{H}-\text{NH}_3]^{\cdot+}$ est plus importante que celui de $\text{z}^{\cdot+}$, qui provient de la cassure de la liaison $\text{N}-\text{C}_\alpha$, dans le cas des espèces solvatées. En effet, ce comportement est opposé à celui observé dans le cas du dipeptide isolé, pour lequel la répartition de l'intensité des ces deux canaux de dissociation est inversée. De plus, la grande similitude entre les trois spectres d'hydratation indique qu'il y a un changement majeur lors de l'attachement d'une molécule d'eau sur la biomolécule isolée mais pas de différences notables ensuite lors de l'augmentation du nombre de molécules d'eau. Ce résultat est intéressant parce qu'il va dans le même sens que les travaux d'E. Williams et collaborateurs, qui ont réalisé une étude similaire en 2006 sur le dipeptide $[\text{AK}+2\text{H}]^{2+}$ doublement chargé (que nous avons également utilisé pour l'expérience du chapitre précédent) environné de méthanol [66]. Il a été montré que la solvation par ce solvant augmentait la perte de NH_3 et réduisait la formation de c^+ et z^+ après capture électronique. Ce résultat est en accord

avec les conclusions que nous venons d'évoquer dans le cas d'un peptide monochargé.

7.1.2 Effets de la présence d'autres solvants

Nous avons souhaité dans cette expérience étudier de façon plus systématique l'effet du solvant sur les voies de fragmentation du dipeptide. Nous avons réalisé plusieurs spectres en attachant à l'espèce $[GA+H]^+$ une molécule d'eau (H_2O), une molécule de méthanol (CH_3OH), une molécule d'acétonitrile (CH_3CN) et enfin une molécule d'éther couronne (CE : molécule présentée dans le chapitre 6 de cette partie). Les spectres de « charge opposée » sont présentés sur la figure 7.4. Il apparaît que les spectres avec l'eau et le méthanol sont pratiquement similaires, alors que l'attachement d'une molécule d'acétonitrile semble limiter la perte de NH_3 et favoriser la formation de l'espèce z^- . Quant à la molécule d'éther couronne, qui complexe le cation peptidique au niveau du groupement NH_3 , elle empêche clairement l'apparition de l'espèce $[GA+H-NH_3]^-$. Le pic majoritaire sur cette portion du spectre est le fragment $C_2H_4O^-$ ($m/q = 44$) dont l'origine est la cassure de la molécule d'éther couronne.

Sur la figure 7.5, nous avons représenté l'évolution du rapport $I([GA+H-NH_3]^-)/I(z^-)$ (où I représente l'intégrale du pic de l'espèce considérée) en fonction du nombre n de molécules de solvant attachées au dipeptide isolé. On peut noter le fait que le rapport diminue lorsqu'une seconde molécule d'acétonitrile est attachée au dipeptide et que le comportement des solvants eau et méthanol semble très proche. Plus précisément, l'attachement d'une deuxième molécule provoque une diminution de la perte de NH_3 au profit de la formation de z^- , alors que la présence de trois molécules de solvant conduit à une augmentation sensible du rapport $I([GA+H-NH_3]^-)/I(z^-)$.

En conclusion de cette étude sur le dipeptide, nous avons mis en évidence la fait que le rapport de branchement entre la perte de NH_3 et la cassure de la liaison $N-C_\alpha$ dépend fortement de la molécule de solvant attaché au dipeptide $[GA+H]^+$. Ces deux fragments provenant de la capture électronique induite dans un gaz de césium. L'eau et le méthanol semble favoriser la perte de NH_3 tandis que la présence d'acétonitrile ou d'éther couronne conduit de façon très préférentielle à la rupture de la liaison $N-C_\alpha$. Ces résultats, notamment dans le cas de l'eau et du méthanol, doivent être modulés selon le nombre de molécules attachées. Il serait par exemple souhaitable d'attacher plus de molécules de solvant afin de confirmer ces comportements. Le contrôle de la conservation de molécules de solvant sur l'espèce n'est pas évidente et cette problématique est discutée dans la partie IV.

7.2 Étude du tripeptide $[AAA+H]^+$

7.2.1 Effets de la présence de méthanol

Nous avons également réalisé des spectres de « charge opposée » lors de collisions entre un faisceau de tripeptides $[AAA+H]^+$ ($A = \text{alanine}$) et des atomes de césium. Le faisceau de biomolécules a été accéléré à une énergie cinétique de 50 keV. En suivant la même

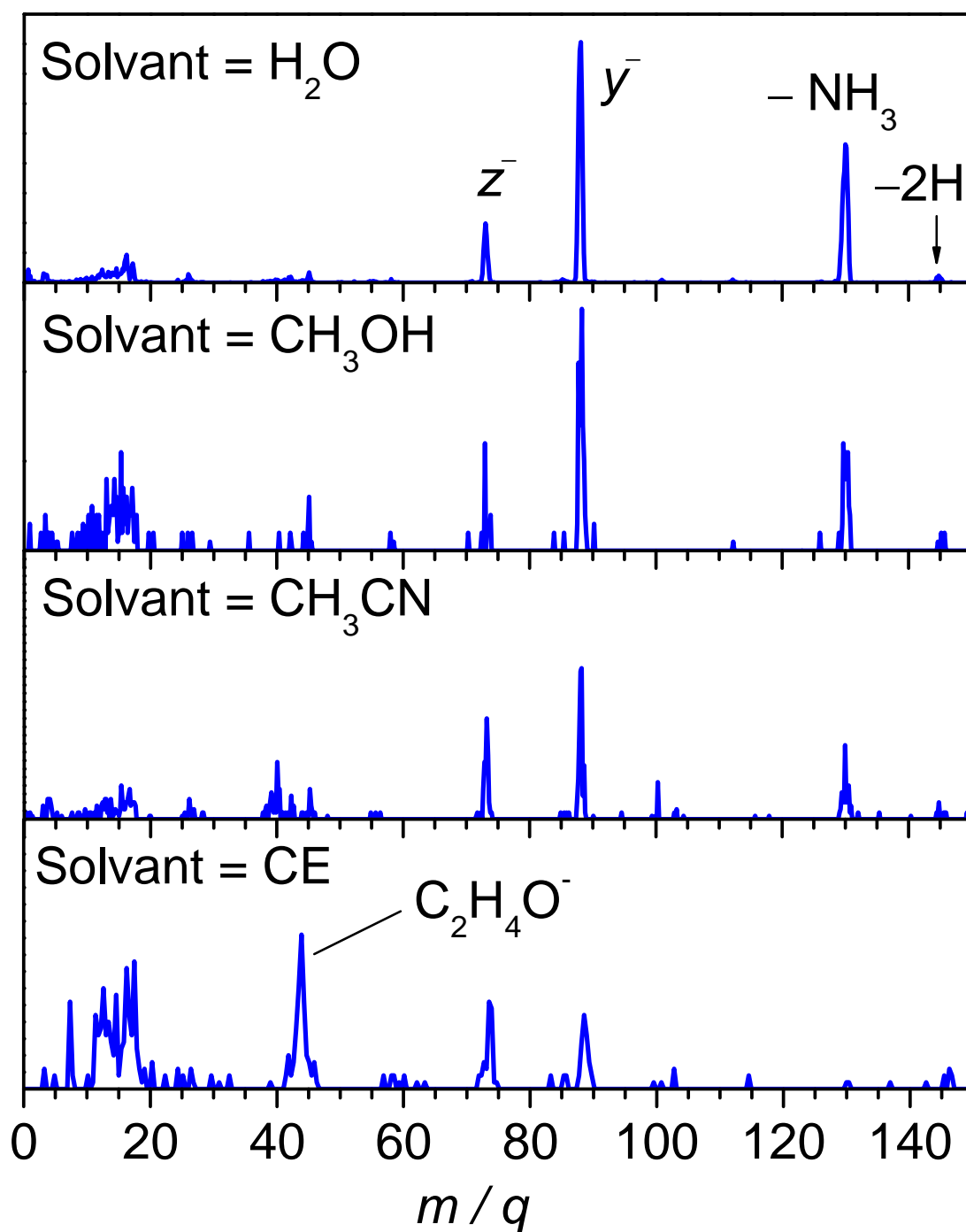


FIGURE 7.4 — Spectres de fragmentation issus de la collision entre le dipeptide solvato $[GA+H]^+(S)$ et des atomes de césium. Il s'agit de spectres de « charge opposée » des fragments négatifs formés lorsqu'une molécule de H_2O , de CH_3OH , de CH_3CN et enfin d'éther couronne est attachée à la biomolécule.

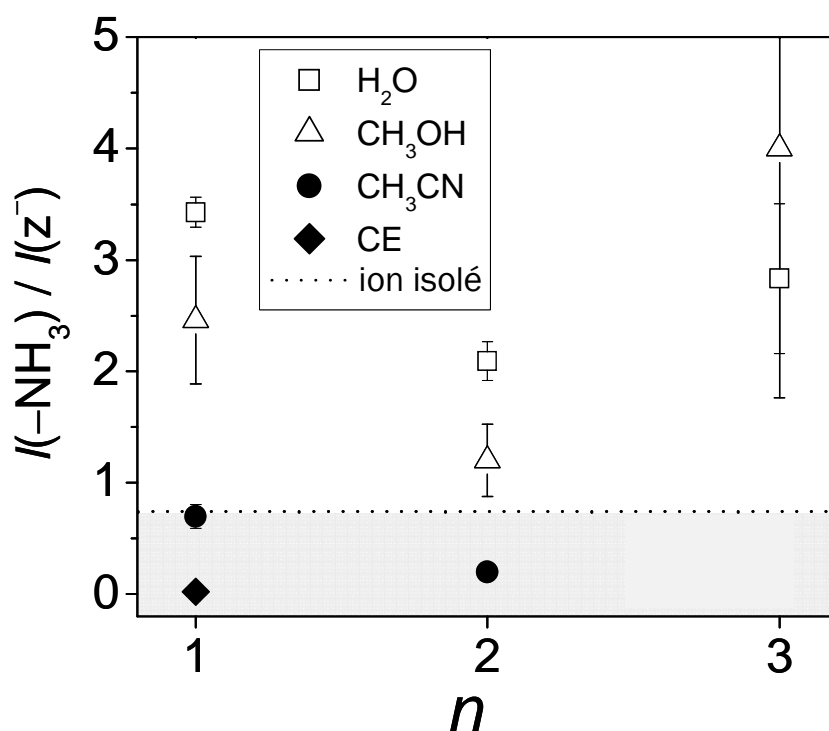


FIGURE 7.5 – Évolution du rapport $I([GA+H-NH_3]^-)/I(z^-)$ en fonction du nombre de molécules de solvant attachées au dipeptide $[GA+H]^+$.

démarche que précédemment, nous avons comparé le spectre de la molécule isolée avec ceux obtenus lorsque l'on attache une, deux ou trois molécules de méthanol (CH_3OH). La figure 7.6 présente la comparaison des quatre spectres. Concernant le tripeptide isolé, on retrouve les fragments z_1^- , z_2^- qui proviennent de la cassure des deux liaisons peptidiques de la molécule suite à une capture électronique, ainsi que la perte de NH_3 . Les espèces y_1^- et y_2^- sont très probablement formées dans un mécanisme similaire à celui que nous avons précisé pour le dipeptide $[GA+H]^+$ (première étape de CID). Remarquons que dans le cas de la biomolécule isolée, la perte de NH_3 est relativement faible comparativement aux voies de dissociation z_1^- et z_2^- dont les intensités sont très proches. Si l'on s'intéresse maintenant aux effets de la solvatation et que l'on regarde le spectre du tripeptide $[AAA+H]^+(CH_3OH)$ ($n = 1$), on observe que le pic dominant est celui lié à la perte de NH_3 alors que les intensités de z_1^- et z_2^- sont pratiquement inchangées. Un comportement tout à fait semblable est mis en évidence pour $n = 2$ et $n = 3$. Cette évolution particulière des intensités des fragments dont l'origine est la capture électronique est donc à la fois valable pour le dipeptide (voir figure 7.1 avec l'eau) et pour le tripeptide (voir figure 7.6 avec le méthanol). Ce résultat semble suggérer que le même mécanisme est responsable de la compétition entre la perte d'ammoniac et la cassure de la liaison $N-C_\alpha$ à la fois pour le di- et le tri-peptide étudiés dans cette expérience.

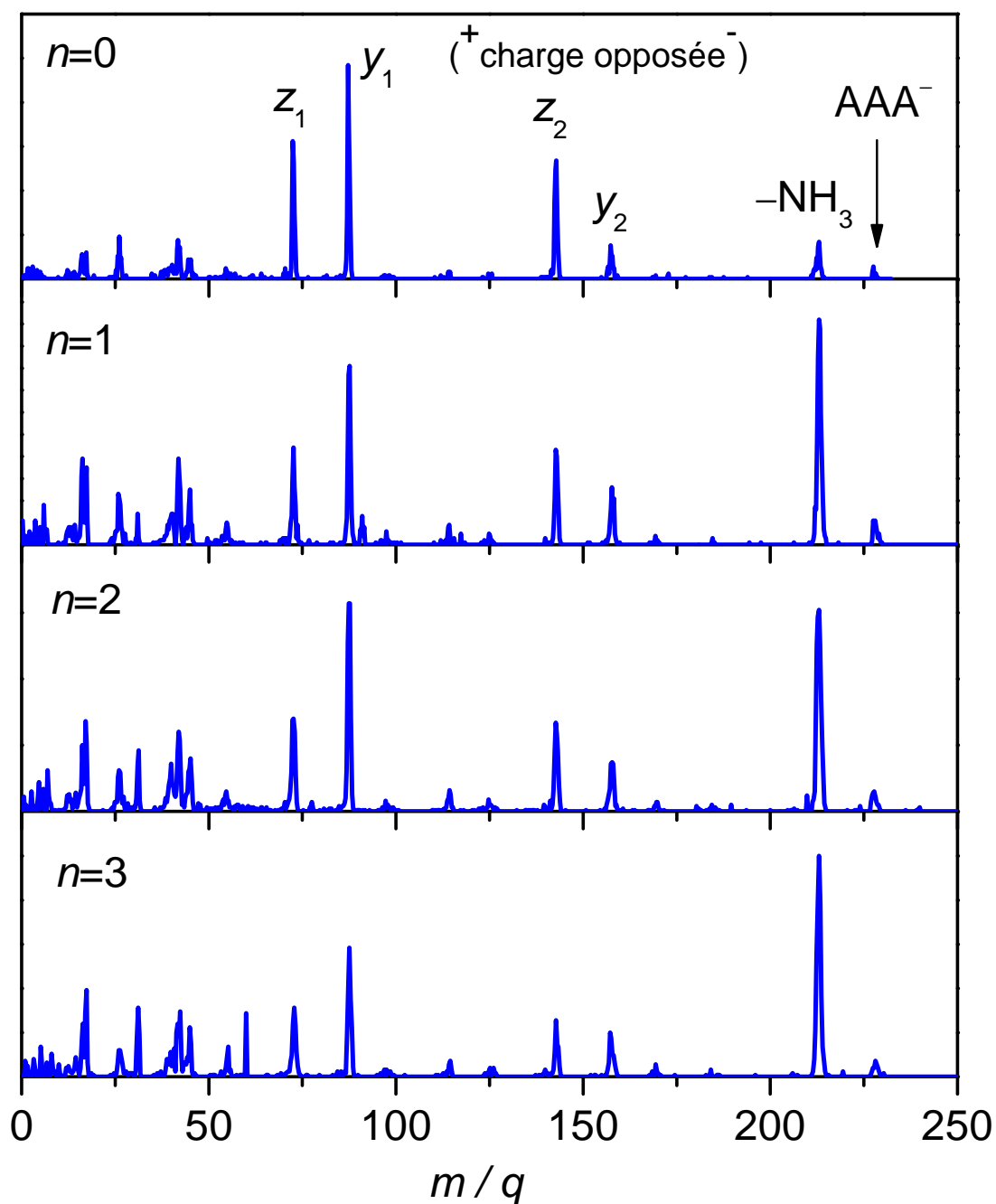


FIGURE 7.6 — Fragments négatifs formés lors de collisions entre le tripeptide solvaté $[GA+H]^+(CH_3OH)_n$ ($n = 0, 1, 2, 3$) et des atomes de césium.

7.2.2 Interprétation des résultats

Nous donnons dans la suite une interprétation de ces résultats en s'appuyant sur les travaux très récents d'E. Williams sur la dissociation de tripeptides dications hydratés $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}(\text{H}_2\text{O})_n$ (où K = lysine et Y = tyrosine) induite par capture d'électrons libres de basse énergie (*ECD* : voir introduction du chapitre 6) [128]. Le changement des rapports de branchement lors de l'attachement d'un nombre croissant de molécules d'eau a été interprété par une diminution de l'énergie de recombinaison disponible pour la fragmentation du peptide. De plus, l'évaporation d'une ou de plusieurs molécules d'eau (la perte d'un H_2O nécessite une énergie d'environ 0,4 eV) conduit à un abaissement de l'énergie interne de la molécule qui va favoriser la canal de dissociation possédant la plus petite énergie d'activation [128]. Selon les calculs de Turecek et Syrstad [121], la perte d'ammoniac est associée à une très faible barrière de l'ordre, également, de 0,4 eV. L'énergie minimale nécessaire à la formation de z_2^+ a été estimée expérimentalement à 1,8 eV en prenant en compte le fait que cette voie n'apparaît plus à partir du tripeptide $[\text{KYK}+2\text{H}]^{2+}(\text{H}_2\text{O})_7$ [128]. En conséquence, l'attachement de molécules d'eau tend à privilégier la perte d'ammoniac par rapport à la rupture de la liaison N- C_α .

À cet égard, la solvation du dipeptide par la molécule d'éther couronne est intéressante. L'énergie de complexation est beaucoup plus importante avec cette molécule qu'avec l'eau ou le méthanol, ce qui tend à affaiblir la liaison C- NH_3 . Cet effet est donc en faveur de la voie de fragmentation conduisant à la perte du groupement NH_3 . Cependant la formation d'un complexe par l'attachement de la molécule d'éther couronne modifie fortement la fonction d'onde électronique de l'état fondamental. La figure 7.7 montre la SOMO

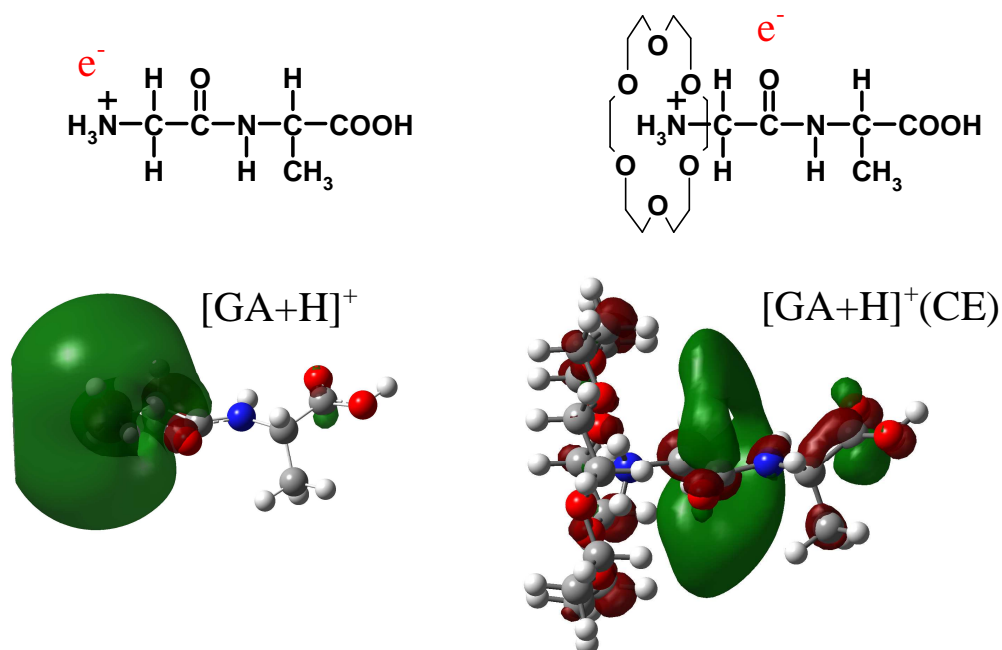


FIGURE 7.7 — Représentation de la SOMO des radicaux neutres formés lors de la capture d'un électron par les cations $[\text{GA}+\text{H}]^+$ et $[\text{GA}+\text{H}]^+(\text{CE})$.

(plus haute orbitale occupée d'un radical) après capture d'un électron par [GA+H]⁺ et [GA+H]⁺(CE)¹. Concernant, le cation [GA+H]⁺, il faut préciser que la différence en énergie avec le second conformère le plus stable n'est que de 0,05 eV. Ce résultat est confirmé par les calculs de Kohtani et collaborateurs [129]. L'orbitale est principalement localisée sur le groupe NH₃⁺. Dans le cas de l'espèce [GA+H]⁺(CE), on constate un déplacement très net de la densité électronique vers le groupement amide. Ceci pourrait expliquer pourquoi la perte de NH₃ est bien moins importante que la cassure la liaison N-C_α. Ceci étant, il est difficile d'avoir des conclusions définitives sur les processus de fragmentation à la seule vue des orbitales moléculaires, qui correspondent à un attachement électronique vertical. Pour obtenir quelques certitudes sur les mécanismes de dissociation, il serait nécessaire d'explorer la façon dont la fonction d'onde électronique évolue après la relaxation géométrique, de calculer les états de transition puis de déterminer les taux de transition. De plus, tous les calculs présentés ici se font à une température de 0 K, ce qui n'est pas représentatif de l'état du système dans l'expérience (300-400 K). Une exploration aussi poussée des surfaces d'énergie potentielle nécessite des compétences pointues en chimie quantique et en modélisation théorique et ce type d'étude est bien au-delà des enjeux de cette thèse. Néanmoins, le calcul des orbitales permet d'avoir une première interprétation des résultats expérimentaux.

1. Les structures des cations ont été optimisées par une méthode DFT au niveau de théorie B3LYP/6-31++G(d,p).

Synthèse

Cette troisième partie, dévolue à la prise en compte d'un environnement autour de la biomolécule, a mis en évidence un certain nombre de conclusions importantes que nous rappelons ci-dessous.

Une première modélisation de l'environnement, nous a conduits à comparer les voies de fragmentation des molécules isolées d'uracile, de thymine, d'adénine, issues de l'impact avec des ions multichargés de basse énergie, avec celles obtenues avec des agrégats de ces mêmes biomolécules. Pour tous les systèmes étudiés, des canaux de fragmentation supplémentaires, non observés pour les molécules isolées, apparaissent pour les agrégats de nucléobases. La voie la plus importante correspond à la perte simultanée d'un atome d'oxygène et d'un atome d'hydrogène (pour la thymine et l'uracile) et à celle d'un atome d'azote et d'un atome d'hydrogène (pour l'adénine). Dans le cas de la thymine, les résultats ont pu être comparés avec la littérature existante sur la phase condensée. De plus, cette voie de fragmentation caractéristique des agrégats de bases azotées est ouverte dès les plus petites tailles d'agrégats. Nous en avons conclu que ces canaux sont très probablement dus à la formation des liaisons hydrogènes entre les atomes d'oxygène et d'hydrogène des molécules de thymine, assurant la cohésion des agrégats. Ceci indique que la géométrie préférentielle des édifices produits est planaire et pas empilée.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la dissociation du dipeptide alanine-lysine doublement protonné induite par capture électronique lors de collision avec des atomes de sodium. Ce processus physique conduit à la formation de trois canaux dominants, la perte d'hydrogène, la perte de NH_3 et la cassure de la liaison N-C_α , conduisant à la formation des fragments c^+ et z^+ . L'importance relative des différentes voies de fragmentation a été étudiée en fonction de la vitesse de l'ion biomoléculaire, du degré de complexation avec une molécule d'éther couronne et du gaz de la collision. Les résultats indiquent que la perte d'hydrogène et d'ammoniac sont des canaux qui entrent en compétition, alors que la cassure de la liaison N-C_α est à peu près indépendante de ces paramètres. Par ailleurs, la complexation du dipeptide par deux molécules d'éther couronne a permis de mettre en évidence le fait que la rupture de la liaison N-C_α ne nécessite pas de transfert de proton en direction du groupement amide de la molécule, alors que ce mécanisme est généralement invoqué dans ce type de dissociation. Ce résultat rejoint des conclusions similaires obtenues dans le cas de peptides ayant subi une réaction de métallation (attachement d'atomes métalliques) [130, 131].

Enfin, dans une démarche visant à caractériser plus précisément les effets de la nano-solvatation, nous avons étudié la fragmentation d'un dipeptide (glycine-alanine) et d'un

tripeptide (alanine-alanine-alanine) protonnés induite par des collisions dans une vapeur de césium. La technique NERMS (*Neutralization-Reionization Mass Spectrometry*) ou dite de « charge opposée » a été utilisée pour convertir les fragments neutres en espèces chargées négativement facilement détectables. Ainsi, il est possible, comme précédemment, de mettre en évidence le fait que les radicaux neutres, issus de la capture électronique, se désexcitent par perte d'hydrogène, d'ammoniac et rupture de la liaison N-C $_{\alpha}$. Pour le dipeptide, la perte de NH $_3$ et la cassure de la liaison N-C $_{\alpha}$ dépendent fortement de la molécule de solvant (eau, acétonitrile, méthanol, ou éther couronne) attachée à la biomolécule. L'attachement d'eau ou de méthanol favorise sensiblement la perte d'ammoniac au détriment de la rupture de la liaison N-C $_{\alpha}$, alors que le comportement inverse est observé pour la présence d'acétonitrile et d'éther couronne. Dans le cas du tripeptide, un effet similaire est observé avec le méthanol, tandis que le rapport de branchement entre les fragments z_1^- et z_2^- ne change pas entre les dipeptides isolés et nano-solvatés. Pour compléter ces résultats, des calculs de DFT révèlent une modification importante de la fonction d'onde électronique de l'état fondamental, dans le cas d'une complexation par la molécule d'éther couronne. En particulier, pour l'espèce [GA+H] $^+$ (CE), on constate un déplacement très net de la densité électronique vers le groupement amide, qui tendrait à expliquer, en accord avec l'expérience, le fait que la perte de NH $_3$ est bien moins importante que la cassure de la liaison N-C $_{\alpha}$.

Les expériences de cette partie mettent bien en évidence la modification des voies de fragmentation lors de la présence de molécules de solvant, constituant un environnement ; ces effets intervenant dès les premières couches de solvation, qu'il s'agisse d'agrégats ou de systèmes hydratés. Néanmoins, il serait intéressant de pouvoir étudier l'ensemble des voies de dissociation de systèmes biomoléculaires plus réalistes (grands systèmes environnés). À cette fin, nous présentons dans la partie suivante de cette thèse, la première étape d'un dispositif expérimental dédié à l'étude de l'interaction entre ces systèmes et des ions multichargés de basse énergie.

IV

**Développements techniques :
mises au point, réalisations et
tests**

8

Source electrospray

Sommaire

- 8.1 Origine et principe du dispositif
- 8.2 Mécanismes de formation, d'émission et de fission des gouttelettes
- 8.3 Description et réalisation de la source à Caen
- 8.4 Premiers tests de fonctionnement
- 8.5 Optimisation du fonctionnement : perspectives

8.1 Origine et principe du dispositif

L'ionisation par electrospray (abrégée en ESI : *ElectroSpray Ionization*) est une technique d'ionisation douce qui permet la formation d'espèces chargées de taille importante en phase gazeuse. Le développement de cette technique débute dans les années 60 avec les travaux de Dole et collaborateurs [132], qui réussissent à produire en phase gazeuse un morceau de polystyrène de 56000 u.m.a.. Le réel essor de la technique est dû à l'équipe de Fenn qui, dans les années 80 et en se basant sur les idées de Dole, développa la source electrospray comme une vraie interface à la spectrométrie de masse [133–138]. Il montra en particulier qu'il était possible de former des protéines multiplement chargées, ce qui permettait de diminuer le rapport m/q en le rendant compatible avec les outils d'analyse en masse de l'époque. Le champ d'applications de ce type de source est extrêmement vaste même si cette technique est principalement utilisée pour les macromolécules d'intérêt biologique (par exemple les protéines). Une immense variété d'espèces a ainsi pu être étudiée en phase gazeuse grâce à cette méthode. On peut citer, entre autres, les polymères, les composés pharmaceutiques, les drogues, les nucléotides, les brins d'ADN, les fullerènes et même de façon plus surprenante les virus, dont les études récentes ont montré qu'ils restaient viables après l'ionisation par electrospray [8, 139–141]. Dans ce contexte, John Bennett Fenn reçut le prix Nobel de chimie en 2002 pour sa contribution majeure au développement de la méthode [142].

Le principe de la source ESI est relativement simple. L'implémentation la plus commune de ce type de dispositif est présentée schématiquement sur la figure 8.1. Une solution, contenant la biomolécule à étudier et dissoute dans un solvant, rentre dans un capillaire par infusion directe à l'aide d'une seringue, dont les débits habituels vont de moins de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 1 mL/min . L'extrémité du capillaire est connectée à une aiguille métallique,

qui est portée à un potentiel de plusieurs kilovolts (généralement entre 3 à 5 kV). Une contre-électrode est disposée à quelques millimètres en face de l'aiguille de sorte qu'un champ électrique intense est créé dans cette zone. Suivant la polarité appliquée à la pointe de l'aiguille, les cations (mode positif) ou les anions (mode négatif) de la solution vont s'accumuler à la surface du liquide. Il en résulte une déformation de la surface du ménisque et la création d'un cône dit de Taylor [143] conduisant à la formation d'un spray de fines gouttelettes chargées (quelques microns de diamètre). Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, les forces de répulsion coulombienne deviennent proches de la tension de surface assurant la cohésion des gouttelettes. Lorsque cette limite, dite limite de Rayleigh [144], est atteinte, les gouttelettes explosent en gouttelettes secondaires de plus petites tailles. Après avoir traversé un capillaire chauffant, favorisant le processus d'évaporation, et grâce aux explosions successives, des ions biomoléculaires partiellement ou complètement désolvatés sont finalement formés, en phase gazeuse. Ils sont ensuite guidés par des éléments optiques à travers différentes enceintes, assurant un pompage différentiel, afin de les amener progressivement vers le système d'analyse en masse.

8.2 Mécanismes de formation, d'émission et de fission des gouttelettes

L'objet de cette partie est de détailler les différentes phases qui conduisent à la formation de cations ou d'anions biomoléculaires en phase gazeuse à partir d'une solution. Bien que les nombreux mécanismes qui entrent en jeu dans l'electrospray ne soient pas complètement élucidés, il est possible de dresser un bilan général des principaux processus nécessaires à son fonctionnement. Dans cette partie, nous nous concentrons sur la formation du spray et sur les mécanismes expliquant la production de biomolécules chargées en phase gazeuse à partir des gouttelettes. Dans la partie 8.5, où il est question de l'optimisation de la source réalisée pendant cette thèse, nous détaillons l'influence des nombreux mécanismes sur le comportement général de la source electrospray, sans se restreindre exclusivement au spray.

La mise en route d'une source electrospray est relativement aisée. Le principe consiste à générer de façon stable un spray de gouttelettes chargées contenant les biomolécules à analyser (souvent appelée analyte). On peut distinguer trois phases qui conduisent à l'établissement d'un jet de particules. Lorsque aucune tension n'est appliquée sur la pointe, on observe la formation d'une goutte quasi-sphérique puisque la tension de surface du liquide et la pression sont les deux seules forces qui agissent à la surface du liquide au bout de l'aiguille. Lorsque la solution est portée à un potentiel positif, l'interface entre le liquide et l'air devient polarisée par la présence d'un excès de charges positives. La surface de la goutte se déforme sous l'action des forces électrostatiques. La géométrie devient alors quasi-conique. Au moment où il y a égalité entre la résultante des forces électrostatiques et la tension de surface, la géométrie devient parfaitement conique. Si l'on augmente la tension positive afin d'atteindre une valeur de champ comprise entre $10^6 - 10^7$ V/m [145, 146], le cône est déstabilisé et la solution est dispersé sous forme

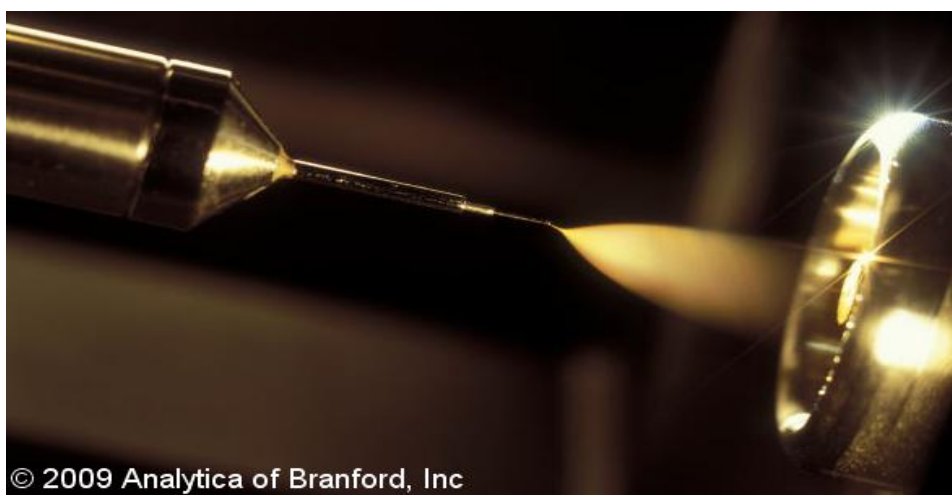
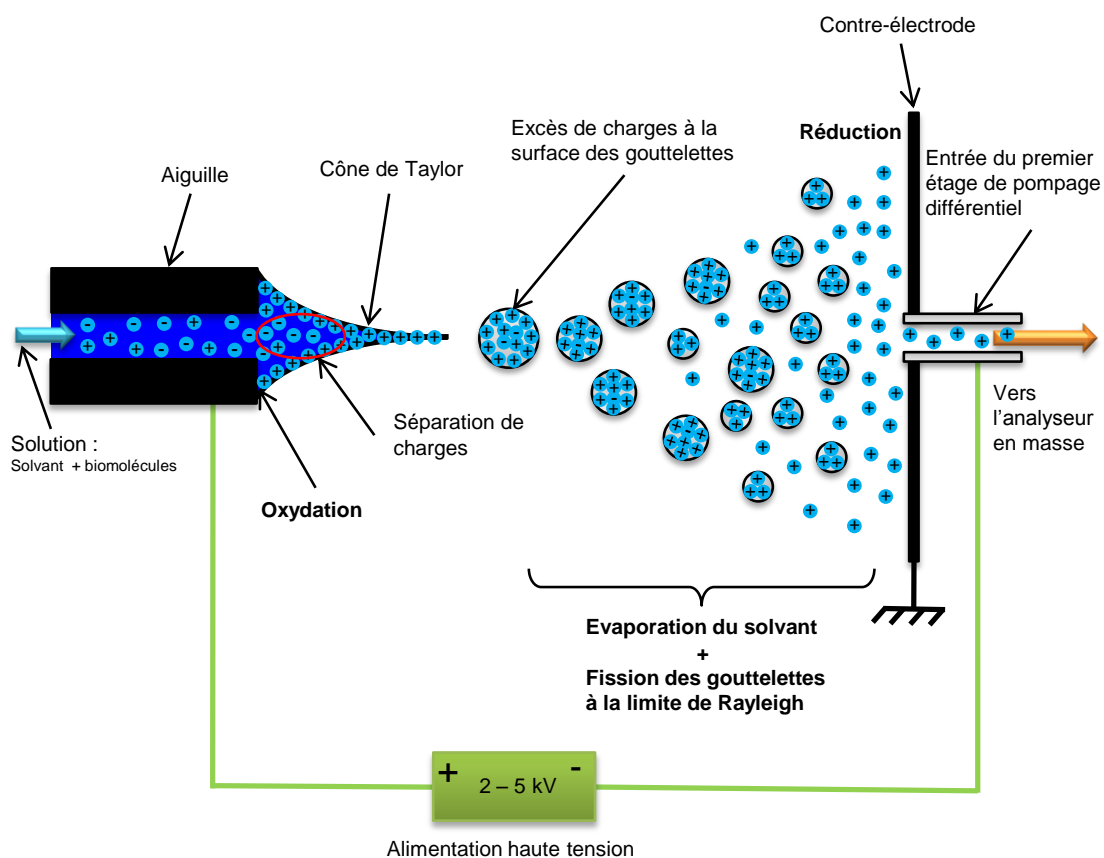


FIGURE 8.1 — Schéma de principe du fonctionnement d'une source electrospray. Une solution contenant les biomolécules à étudier est injectée à travers une aiguille métallique. Cette dernière est portée à un potentiel de l'ordre de 2 - 5 kV, ce qui conduit à la formation d'un spray de gouttelettes chargées. L'évaporation du solvant et les fissions successives des gouttelettes permettent la création en phase gazeuse d'ions biomoléculaires partiellement ou totalement désolvatés.

de fines gouttelettes à l'apex du cône de Taylor, où le champ électrique est maximum (voir figure 8.3-A,B,C). Ces gouttelettes primaires portent une charge nette positive. Afin d'entretenir ce spray, un pousse-seringue injecte en continu la solution à un flux de l'ordre de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$. Comme la génération des gouttelettes se fait à pression atmosphérique et à température ambiante, l'évaporation du solvant est importante et la densité de charges à la surface des gouttelettes augmente. Quand la répulsion coulombienne est égale à la tension de surface, la limite de stabilité de Rayleigh est atteinte. Elle est définie par l'équation suivante :

$$q_R = 8\pi\sqrt{\epsilon_0\gamma R^3} \quad (8.1)$$

où R est le rayon, γ la tension de surface et ϵ_0 est la permittivité du vide. Une fission asymétrique de la gouttelette provoque alors la formation de gouttelettes satellites de plus petites tailles (remarquons que des fissions symétriques sont également observées, mais de façon plus rare). Comme cela a été observé initialement par Gomez et Tang [147], les gouttelettes chargées ne sont pas statiques mais elles se déforment et alternent entre une géométrie aplatie et allongée. Ces irrégularités de forme stimulent l'émission de jets par une forte augmentation locale du champ électrique (voir figure 8.3-D). Les gouttelettes satellites formées emportent moins de 3% de la masse et environ 10-30% de la charge de la goutte initiale [148–150]. Le rayon moyen de ces gouttelettes est d'environ un dixième de celui de la gouttelette parent. Tang et Smith [151] ont montré que le nombre de fissions qui interviennent dans ce processus dépend principalement de la taille des gouttelettes initiales. Sur la base de calcul théorique, ils ont montré que les gouttelettes satellites deviennent instables environ dix fois plus rapidement que les gouttelettes qui leur ont donné naissance. Elles sont donc très probablement à l'origine de la formation des premiers ions en phase gazeuse. Les gouttelettes parents, quant à elle, vont produire d'autres gouttelettes satellites à la suite de fissions coulombiennes supplémentaires.

Ainsi, après plusieurs cycles d'évaporation du solvant et de fissions coulombiennes, des ions biomoléculaires désolvatés sont générés en phase gazeuse. Bien que très largement étudiés, les mécanismes de désorption, qui conduisent à ces ions désolvatés, sont encore discutés. Deux modèles principaux sont mis en avant pour expliquer la façon dont des ions biomoléculaires peuvent se retrouver en phase gazeuse à partir de gouttelettes fortement chargées.

Dans les deux modèles, la formation de gouttelettes de plus en plus petites est expliquée par l'évaporation du solvant et des phénomènes de fissions coulombiennes consécutifs aux instabilités de Rayleigh. Dans le premier modèle (CRM : *Charge Residue Model*) proposé par Dole [132], cet enchaînement se poursuit jusqu'à ce que la taille des gouttelettes ne permette plus de contenir qu'un seul ion d'intérêt biologique. La biomolécule retiendrait la charge de la gouttelette résiduelle lors de l'évaporation de la dernière molécule de solvant. Le second modèle (IEM : *Ion Evaporation Model*) propose qu'à partir d'une certaine taille de gouttelettes (généralement inférieure à 10 nm de rayon), la force du champ à la surface du liquide devienne suffisamment intense pour qu'un ion biomoléculaire présent à la surface de la goutte puisse s'en échapper [152]. Ainsi, Iribarne et Thomson ont montré que le champ

créé par l'excès de charges à la surface de la gouttelette pouvait provoquer l'évaporation d'ions directement en phase gazeuse. La différence fondamentale entre les deux modèles tient donc en la manière dont l'analyte est séparée des autres biomolécules contenues dans la gouttelette. Dans le modèle CRM, la séparation est le résultat des multiples fissions qui, à la fin du processus, conduisent à la formation d'une gouttelette qui ne contient qu'une molécule d'analyte. De façon radicalement différente, le modèle IEM prévoit que la séparation intervient quand une biomolécule est désorbée de la gouttelette en emportant une partie de l'excès de charges, afin de limiter la répulsion coulombienne. Remarquons qu'il n'est, bien sûr, pas possible de recourir à une méthode optique pour tester les mécanismes puisque la taille des gouttelettes, lors de la libération de la biomolécule en phase gazeuse, est bien trop petite (< 10 nm) [153].

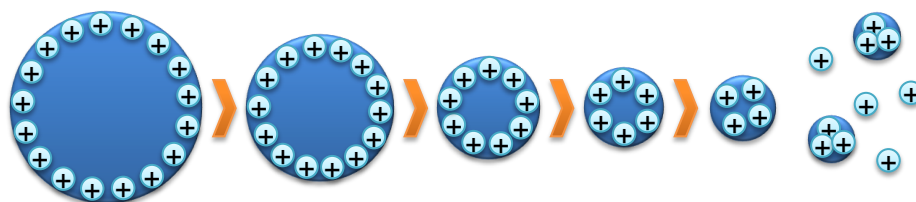
Bien que le débat reste ouvert, un solide consensus scientifique a émergé et tend à considérer que les très grandes molécules sont formées par un mécanisme de type CRM [154–157]. En particulier, Fenn a montré que le modèle proposé par Dole était applicable lorsque la biomolécule possède une dimension linéaire plus grande que la gouttelette qui la contient [158]. Le cas des espèces de plus petites tailles reste plus épineux, même s'il semble raisonnable, aujourd'hui, de considérer qu'une contribution des deux modèles (avec un penchant plus ou moins prononcé selon les analytes utilisés) permet d'expliquer convenablement les observations expérimentales pour de tels systèmes.

8.3 Description et réalisation de la source à Caen

Le système complet de production de biomolécules en phase gazeuse, assemblé pendant ma thèse, consiste en une source electrospray, permettant notamment la production de systèmes nano-solvatés, et un dispositif de sélection en masse (quadripôle). La source electrospray a été réalisée en étroite collaboration avec le groupe de Preben Hvelplund, spécialiste de ce type de dispositif, de l'Université d'Aarhus (Danemark). Dans le cadre de ce projet instrumental, plusieurs voyages au Danemark pour la mise au point de la source ont été organisés. Les pièces mécaniques de l'electrospray ont été fabriquées à Aarhus. L'assemblage des différents éléments de la source a été effectué à Caen. La sélection du rapport m/q des molécules produites par la source est assurée par un quadripôle commandé auprès de la société Extrel. L'objectif de ce développement instrumental était donc double. Il s'agissait, dans un premier temps, de comprendre précisément le fonctionnement de cette technique nouvelle pour le laboratoire, de concevoir, sur la base des modèles existants à Aarhus, une source electrospray adaptée aux expériences futures de l'équipe (sur les espèces nano-solvatées et les agrégats d'eau, entre autres), de l'assembler et de tester son bon fonctionnement. Dans un second temps, il fallait développer une partie de guidage et de sélection en masse à partir d'un quadripôle commercial, afin d'optimiser la transmission des espèces biomoléculaires en sortie. En début de thèse, une étude de conception se basant sur des simulations de trajectoires de particules avec le logiciel SIMION¹ a été réalisée.

1. <http://www.sisweb.com/simion.htm>

Modèle proposé par Dole : CRM (Charged Residue Model)



Modèle proposé par Iribarne et Thomson : IEM (Ion Evaporation Model)

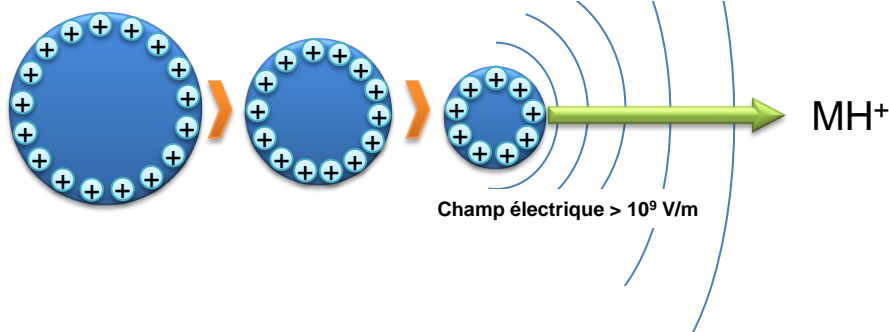


FIGURE 8.2 – Deux modèles permettent d’expliquer la formation de biomolécules complètement désolvatées en phase gazeuse. En haut, celui proposé par Dole [132] suggère que les séquences d’évaporations du solvant et de fissions continuent jusqu’à la formation de gouttelettes très petites dans lesquelles ne subsiste qu’une seule biomolécule. En bas, Iribarne et Thomson [152] ont soumis l’idée que le champ à la surface de la goutte pouvait devenir suffisamment intense pour qu’une biomolécule chargée soit éjectée directement en phase gazeuse.

Par ailleurs, pour des raisons pratiques, nous souhaitons que le système soit entièrement pilotable depuis un ordinateur. Les alimentations des différents éléments de l’electrospray et du quadripôle ont été conçues pour permettre d’obtenir une excellente stabilité, une polarité réversible et un contrôle complet depuis une interface informatique. Un important travail de conception, de réalisation et de programmation a donc été effectué pendant cette thèse en parallèle des expériences présentées dans les parties précédentes.

Nous détaillons dans les trois sous-parties suivantes, la réalisation de la source, l’adaptation du quadripôle à ce premier élément et enfin, la conception des alimentations et du programme de contrôle du dispositif.

8.3.1 Source electrospray

Le schéma général de la source electrospray est présenté sur la figure 8.4. La zone de formation du spray se trouve directement à l’atmosphère. Elle se compose du support du système d’injection ① et de l’entrée d’un capillaire chauffant ② qui permet de faciliter l’évaporation du solvant des gouttelettes. Comme le montrait précédemment le schéma de la figure 8.1, le dispositif d’injection ① comporte une aiguille en inox de 0,8 mm de diamètre extérieur. La solution, contenue dans une seringue en verre de 100 μL (marque *SGE*), est infusée à travers l’aiguille par l’intermédiaire d’un capillaire en silice de 75 μm de diamètre

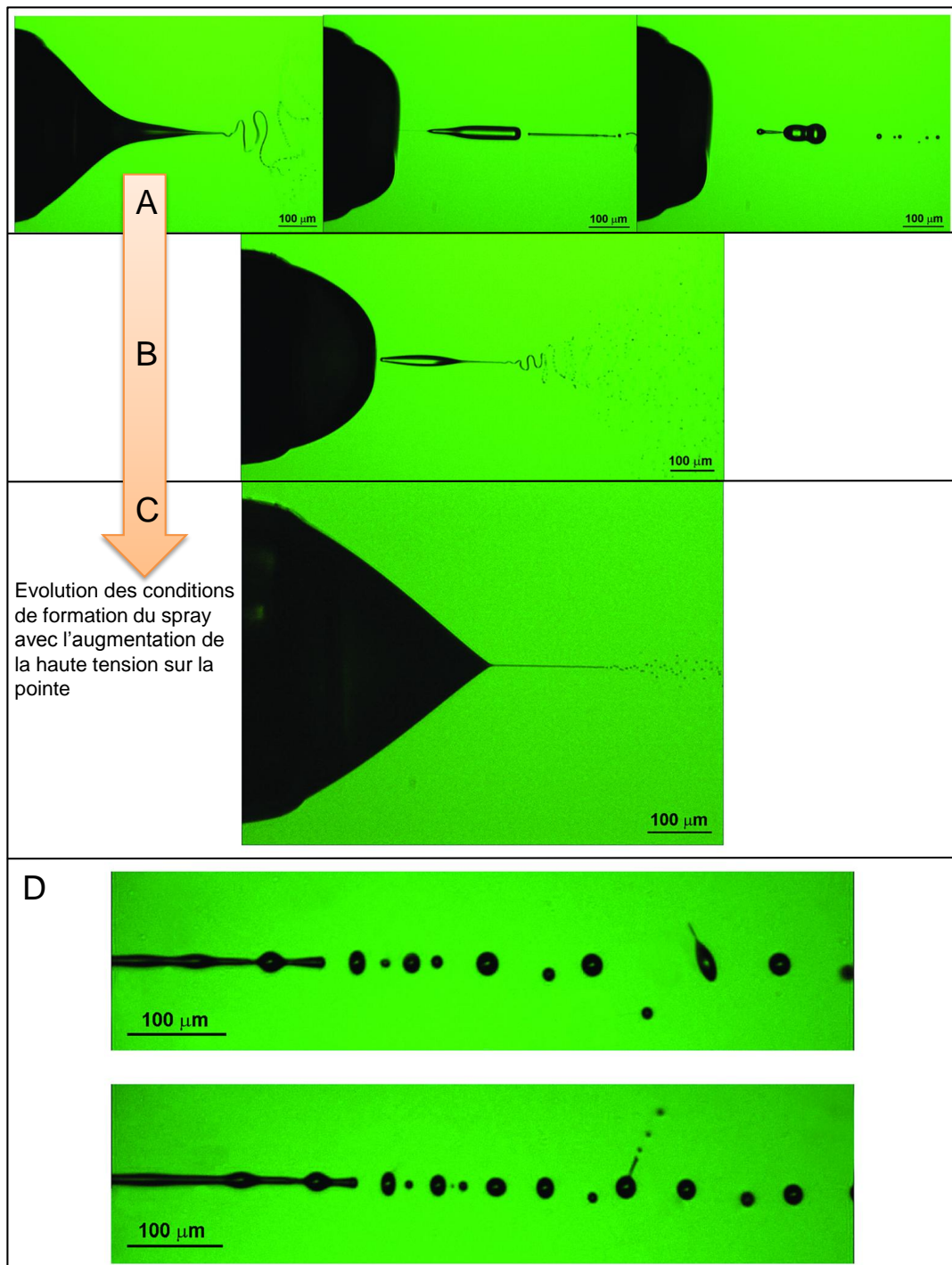


FIGURE 8.3 – Les images A, B, C, permettent une comparaison des modes d'éjection du liquide à la formation du ménisque lors de l'augmentation de la haute tension au niveau de l'aiguille. Le cliché C correspond au mode de fonctionnement le plus stable et le plus approprié pour l'electrospray. C'est dans ce mode que les gouttelettes sont les plus petites et les plus nombreuses, l'efficacité de production des biomolécules est alors maximale. Les deux photographies en D montrent la cassure de la pointe du cône de Taylor, mais aussi et surtout la fission des gouttelettes primaires conduisant à l'émission radiale de jets secondaires. Les images sont reproduites de la référence [159].

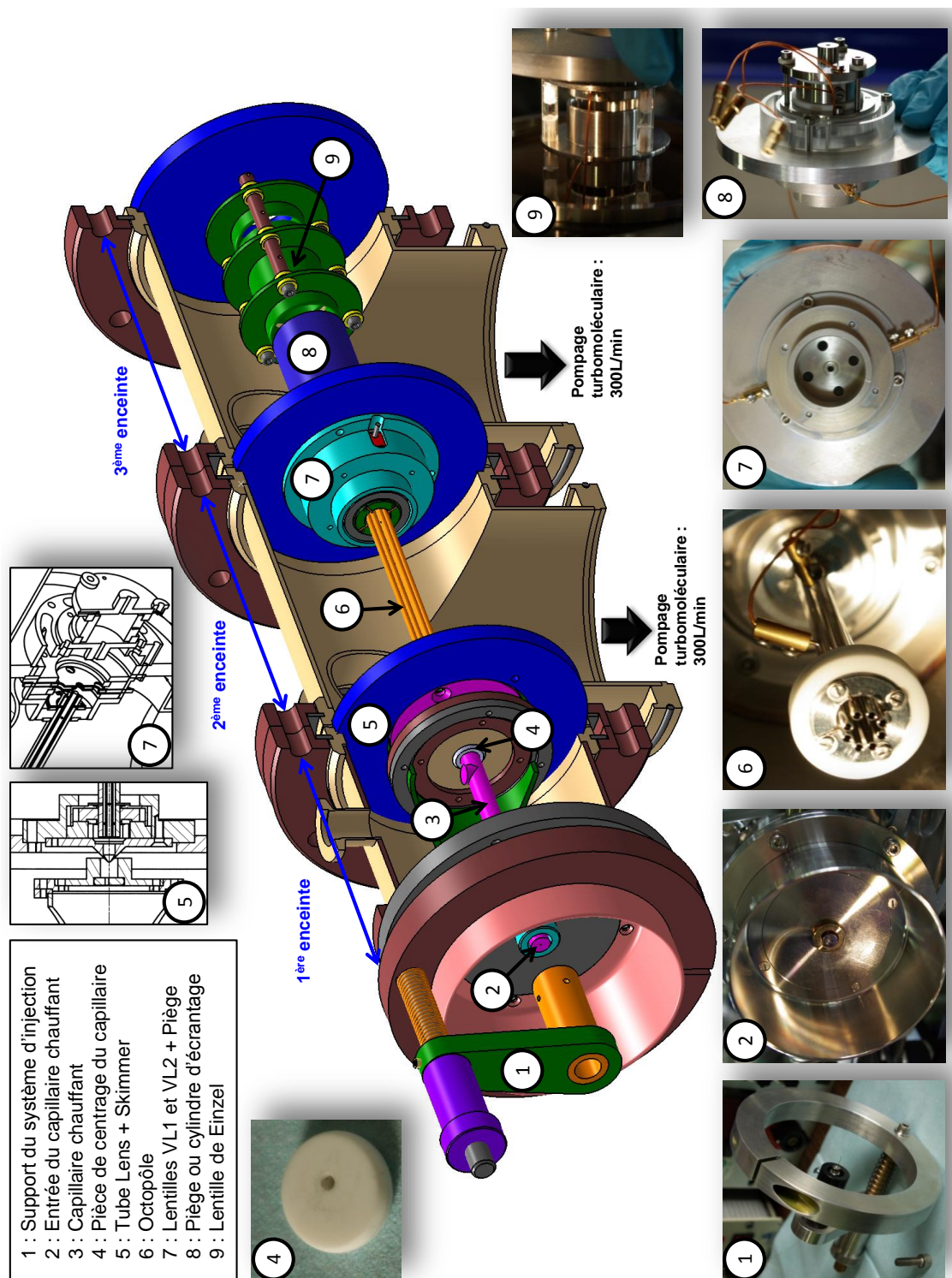


FIGURE 8.4 — Schéma général de la source electrospray construite pendant cette thèse. Elle permet une ionisation douce des macromolécules d'intérêt biologique et leur mise en phase gazeuse. Le faisceau obtenu peut ensuite interagir avec des faisceaux d'ions multichargés de basse énergie. Tous les paramètres de la source peuvent être ajustés de sorte qu'il est possible de produire des espèces solvatées, contrairement aux sources commerciales habituelles. Les différents éléments numérotés sont détaillés dans le texte.

intérieur et de 190 μm de diamètre extérieur (marque *SGE*). Le flux est entretenu par un système de pousse-seringue (*Harvard Apparatus Pump 11 Plus*) afin de garantir un débit constant. La connection entre le capillaire en silice et la seringue est réalisée au moyen de petits morceaux de tube en plastique de diamètres décroissants qui s'ajustent parfaitement au diamètre extérieur de l'aiguille de la seringue et à celui du capillaire en silice. Ils sont solidarisés par un raccord métallique (*Supelco*). À l'autre extrémité du capillaire en silice, la connection avec l'aiguille est légèrement différente, afin de permettre le contact électrique. L'aiguille est insérée dans un tube métallique pincé dans un raccord (provenance *Supelco*). Ce raccord en métal est positionné dans un manchon isolant au travers duquel quatre vis métalliques permettent de centrer précisément l'aiguille. La haute tension nécessaire à la formation du spray est connectée à l'une de ces vis conductrices. La distance qui sépare le bout de l'aiguille du capillaire chauffant est d'environ 1 cm.

Après cette première zone de formation des gouttelettes, se trouvent trois enceintes pompées différenciellement permettant d'amener progressivement les espèces biomoléculaires dans la région du quadripôle, où réside un vide de l'ordre de 2×10^{-8} mbar (pendant le fonctionnement de l'electrospray). Le pompage du premier étage est assuré par une pompe à palettes de marque Alacatel de 40 m^3/h . Cette importante capacité de pompage est nécessaire pour assurer un vide de l'ordre de 1,4 mbar à cause de la présence du capillaire chauffant ③, dont l'orifice d'entrée est à l'atmosphère. Cette fuite permanente sur l'atmosphère permet l'introduction des ions dans le premier étage de pompage. Cette configuration est adoptée dans les sources commerciales de la marque *Thermo Finnigan*. Il existe cependant différentes variantes selon les constructeurs. Certains proposent, par exemple, de remplacer le capillaire par un courant d'azote chaud ce qui permet d'améliorer la sensibilité [160]. Ceci étant, bien que cette technique soit particulièrement efficace pour désolvater les espèces, elle ne permet pas un contrôle précis du degré de solvation comme ce peut être le cas avec un capillaire chauffant. Un soin particulier a donc été apporté au moment de la conception de la régulation de la température du capillaire. Un régulateur PID (Eurotherm, modèle 32h8) associé à une sonde de température PT100 directement implantée dans le capillaire chauffant, permet un contrôle à 0,5 °C près. Le capillaire est isolé électriquement de la masse de l'enceinte, de sorte qu'il est possible de polariser cet élément. Une lentille et un écorceur sont disposés au niveau de la jonction ⑤ entre la première et la deuxième enceinte. La lentille, appelée *Tube Lens*, est un cylindre de 10 mm de long et de 8 mm de diamètre, à l'intérieur duquel pénètre l'avant du cône de l'écorceur (1 mm de diamètre). Cette configuration permet de focaliser le faisceau produit en sortie de capillaire chauffant, afin de le faire passer dans la deuxième enceinte. A cet égard, on peut noter que la pièce ④ permettait de décentrer légèrement la capillaire chauffant de l'entrée de l'écorceur, évitant ainsi qu'un flux de particules neutres trop important puisse passer à travers la source. Les premiers tests ont montré que cela diminuait sensiblement l'intensité du faisceau et nous avons décidé d'utiliser une pièce parfaitement centrée sur l'axe de la source (engendrant une production de neutres probablement plus importante).

Les ions passant à travers l'écorceur sont ensuite guidés par un octupôle ⑥ dans la

seconde enseinte. Une pompe turbomoléculaire de 300 L/min (Varian Turbo-V 301 Navigator) permet d'atteindre un vide résiduel de $1,8 \times 10^{-3}$ mbar dans cette deuxième zone. L'octupôle ⑥ est réalisé à partir de barres en acier inoxydable de 133 mm de long et de 1 mm de rayon. Le diamètre intérieur est de 5,5 mm. S'agissant d'un système de guidage, l'octupôle fonctionne uniquement avec une tension radio-fréquence [161]. Les électrodes sont reliées en deux paires de quatre barres non adjacentes et sont connectées à un signal alternatif de fréquence 2,54 MHz et d'amplitude 120 V en opposition de phase pour chaque paire. À la sortie de l'octupôle, deux lentilles ⑦ (nommées VL1 et VL2) focalisent le faisceau pour permettre son passage dans la troisième enceinte. Chaque lentille est fabriquée à partir d'un disque en aluminium de 31 mm de diamètre percé d'un trou central de 2,5 mm de diamètre. Ce dispositif optique termine la deuxième enceinte de la source.

La pression dans la troisième et dernière enceinte de l'electrospray est de l'ordre de 10^{-6} mbar. Le pompage est également réalisé au moyen d'une pompe turbomoléculaire de 300 L/min (Varian Turbo-V 301 Navigator) comme dans le second étage. Lors de l'assemblage de la source, nous avons installé après le système de focalisation des deux lentilles (VL1 et VL2), un piège électrostatique de 5 cm³ de volume ⑧. L'objectif de ce piège était de permettre la formation de paquets de biomolécules pour obtenir un faisceau pulsé. Cela permettait également d'augmenter la densité d'ions dans le paquet. Un schéma technique du piège est visible sur l'image ⑦ de la figure 8.4. Lors des premiers tests et des expériences réalisées dans le cadre de cette thèse, nous l'avons remplacé par un tube d'écrantage, afin de faciliter le guidage du faisceau en mode continu. Le piège reste néanmoins disponible pour des expériences futures en mode pulsé. Le cylindre d'écrantage ⑧ est représenté en bleu sur le schéma en 3D de la source (la photographie ⑧ correspond, quant à elle, au piège). Il s'agit d'un tube de 30 mm de diamètre, qui permet de créer un potentiel électrique constant et ainsi d'isoler le faisceau de biomolécules de très basse énergie (inférieure à 12 eV) de la masse de l'enceinte. Le faisceau termine son trajet à l'intérieur de la source par le passage à travers une lentille de Einzel ⑧ (chacun des trois tubes de la lentille possède un diamètre de 30 mm) avant d'arriver dans la zone du quadripôle de sélection en masse.

8.3.2 Quadripôle de sélection en masse

Le schéma général du système de sélection en masse est présenté sur la figure 8.5. L'ajout de ce dispositif à la source electrospray permet d'obtenir un système compact et facilement transportable de production, en phase gazeuse, de biomolécules sélectionnées en masse. Le dispositif repose sur l'utilisation d'un quadripôle commercial de marque Extrel ④. Les bases théoriques du fonctionnement d'un quadripôle ayant été résumées précédemment (chapitre 1, page 13), nous nous intéressons uniquement à une description technique de l'appareil. Il est constitué de quatre barres cylindriques de 6 mm de diamètre et de 17 cm de long. Le diamètre intérieur du quadripôle est de 5,5 mm. Des électrodes supplémentaires sont disposées à l'avant et à l'arrière de ces quatre barres de façon à faciliter l'entrée des ions dans le dispositif. Une tension de l'ordre d'une vingtaine de volt est généralement appliquée sur ces pré- et post-filtres. L'alimentation radio-fréquence du quadripôle fonc-

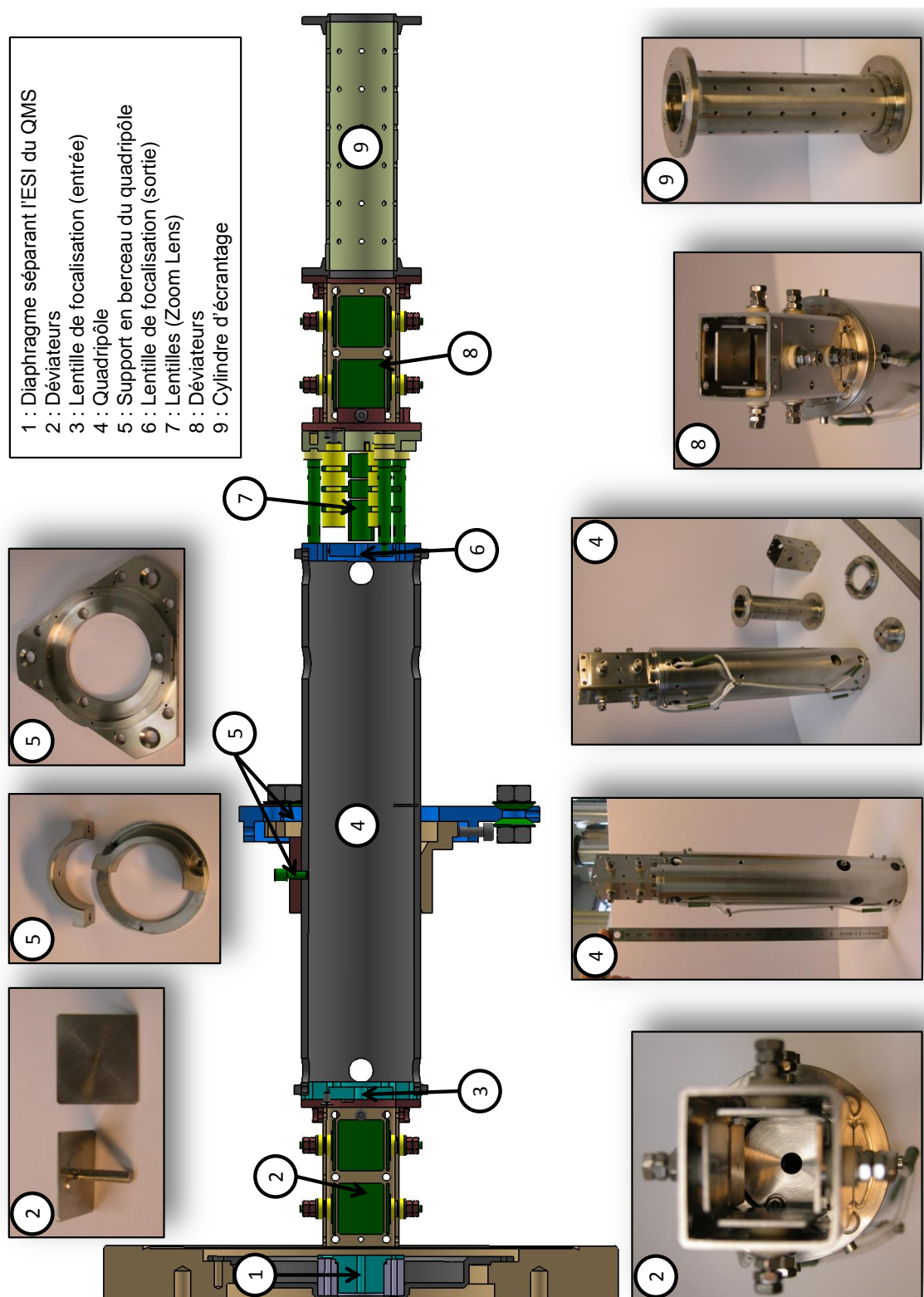


FIGURE 8.5 – Schéma général du quadripôle de sélection en masse. L'adaptation à la source electrospray et les différents éléments optiques de guidage du faisceau ont été conçus et réalisés pendant cette thèse. Le quadripôle permet de sélectionner des espèces possédant un rapport m/q maximum de 10000 unités de masse atomique. Il accepte des faisceaux incidents d'énergie cinétique comprise entre 2 et 12 eV. Les différents éléments numérotés sont détaillés dans le texte.

tionne à fréquence constante (880 kHz) et la sélection du rapport m/q s'effectue donc par la variation de la tension continue U (pouvant atteindre ± 800 V) et de la tension alternative V (pouvant atteindre une valeur crête à crête de 7200 V). Le rapport m/q maximal est de 10000 u.m.a.. L'alimentation (Extrel 150QC RF/DC) est directement pilotable par un signal 0-10 V avec la correspondance suivante : 1 mV = 1 unité de masse atomique. Le contrôle commande provient d'un rack d'alimentation, que nous avons construit pendant cette thèse et qui est détaillé dans la partie 8.6. Les simulations de trajectoires de particules, réalisées pendant la phase de mise au point du dispositif, ont mis en avant la nécessité d'un faisceau très peu divergent et parallèle à l'axe du quadripôle pour obtenir la meilleure transmission possible. Des éléments d'optique supplémentaires ont donc été fabriqués dans cet objectif.

L'enceinte du système de sélection en masse est équipée d'une pompe turbomoléculaire (Varian Turbo-V 551 Navigator) de 500 L/min. Le vide primaire est assuré par une pompe à palettes sèches de 28 m³/h (Alcatel). Le vide est de quelques 10^{-8} mbar, ce qui permet de réduire les collisions avec le gaz résiduel. Le pompage différentiel entre le troisième étage de la source electrospray et l'enceinte du quadripôle est assuré par la présence d'un diaphragme ① de 15 mm de long et de 3 mm de diamètre. Deux jeux de déviateurs ② constitués de 8 plaques carrées en inox de 20 mm par 20 mm ont pour but de rendre l'angle entre le faisceau de biomolécules et l'axe des électrodes du quadripôle aussi faible que possible. Les lentilles ③ et ⑥ permettent une focalisation du faisceau à l'entrée puis à la sortie de la sélection en masse. Afin de pouvoir changer l'énergie du faisceau en sortie du quadripôle, une lentille de type *Zoom Lens* (c'est-à-dire où les trois électrodes sont indépendantes) a été disposée après le quadripôle. L'énergie du faisceau de biomolécules peut ainsi être augmentée jusqu'à environ 150 eV. Remarquons que pour un fonctionnement optimal du quadripôle, il est nécessaire que le faisceau de biomolécules incident possède une énergie cinétique comprise entre 2 et 12 eV. Pour cela, il est possible d'appliquer un *offset* sur les barres du quadripôle. Cet *offset* est nommé *Pole Bias* et permet un contrôle précis de l'énergie du faisceau entrant. En effet, si un faisceau monochargé possède une énergie cinétique de 20 eV, l'application d'un offset de 10 V permet de revenir dans la gamme d'énergies utilisables avec le quadripôle. Remarquons également qu'il est possible de faire varier cette tension *Pole Bias* de façon à couper la transmission du faisceau dans le dispositif. La fin du dispositif de guidage consiste, à nouveau, en un jeu de déviateurs ⑧ et en un cylindre d'écrantage ⑨ dont le but est identique à celui présent dans la source electrospray. Il permet ainsi au faisceau de biomolécules d'être guidé jusqu'à un détecteur ou à une zone d'interaction.

8.3.3 Alimentations pilotables et programme de commande

La finalité du projet instrumental de cette thèse était également de réaliser un dispositif entièrement pilotable, permettant une utilisation aisée à partir d'un ordinateur. Ainsi, la polarisation des éléments optiques de la source electrospray et du quadripôle est effectuée grâce à un rack, qui contient l'ensemble des alimentations et circuits électroniques neces-

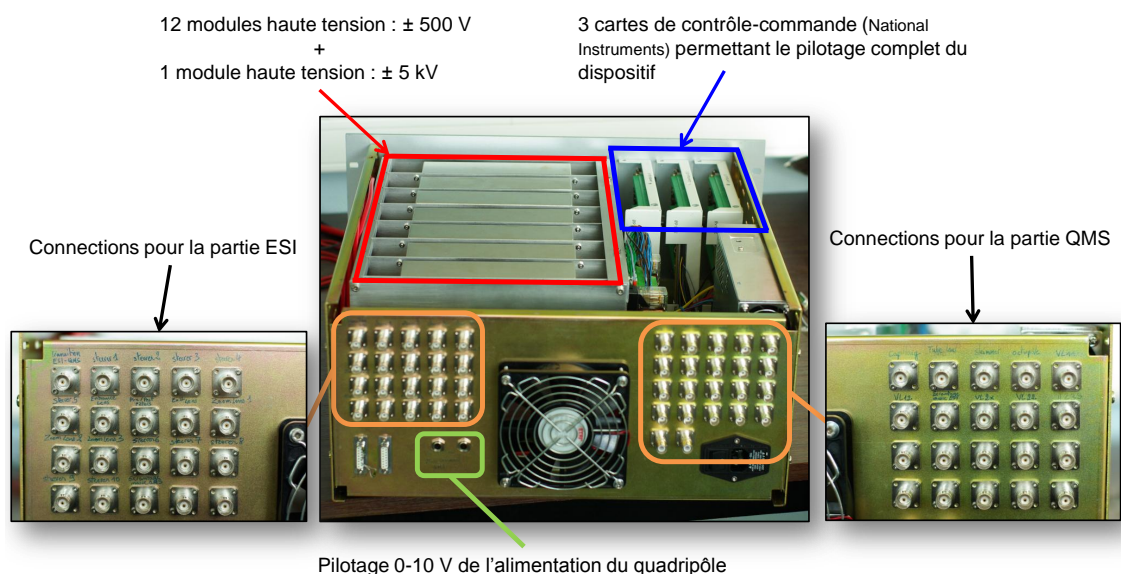


FIGURE 8.6 – Schéma du module de pilotage des différentes tensions du dispositif de production de biomolécules en phase gazeuse. Il permet de produire les tensions nécessaires à la polarisation des éléments optiques de la source et le contrôle de l'alimentation radio-fréquence du quadripôle.

saires au fonctionnement complet du dispositif. Ce rack a été conçu et mis au point au laboratoire pendant ma thèse. Il est associé à l'alimentation du quadripôle et au module de régulation de la température du capillaire chauffant de l'électrospray. Ce rack de pilotage du dispositif expérimental est présenté sur la figure 8.6. Il contient trois borniers électroniques de connections provenant de chez National Instruments. Ils sont reliés à trois cartes PCI intégrées dans un ordinateur. Ces cartes, équipées de convertisseurs analogique-numérique et numérique-analogique 16 bits, assurent à la fois la production de signaux 0-10 V, de signaux TTL, la relecture des tensions envoyées et l'acquisition des signaux provenant d'un détecteur de particules. Lorsque les tensions de polarisation nécessaires excèdent 10 V, 12 modules amplificateurs ± 500 V sont prévus pour fournir le supplément de tension. L'alimentation haute tension de l'aiguille de l'électrospray est assurée par un module supplémentaire ± 5 kV. Il s'agit d'éléments amplificateurs de haute précision à faible ondulation résiduelle (inférieure à 12 mV à pleine échelle) et à polarité réversible par signaux TTL. Grâce à ces modules, il est possible de passer très rapidement d'un mode de production d'espèces positives à un mode négatif. L'ensemble du rack permet le pilotage de plus de 40 tensions. Un circuit particulier est dédié au contrôle de l'alimentation du quadripôle et en particulier de la sélection du rapport m/q , du *Pole Bias* et des paramètres de résolution du quadripôle.

Le pilotage de l'ensemble des paramètres est réalisé au moyen d'un programme Labview, dont quelques captures d'écran sont visibles sur le figure 8.7. Outre le contrôle de la source électrospray (tensions, débit du pousse-seringue), il est possible d'utiliser le quadripôle en tant que guide d'ions (mode radio-fréquence uniquement), où d'effectuer un balayage sur une gamme choisie du rapport m/q . Enfin, une fonction de détermination de la distribution en énergie du faisceau a également été implémentée. Pour cela, le programme fait varier la

tension du *Pole Bias* jusqu'à couper la transmission du faisceau. De la courbe obtenue, il est possible d'en déduire précisément l'énergie du faisceau et sa dispersion (voir 8.4.1). Enfin, tous les paramètres du dispositif peuvent être enregistrés puis rechargés ultérieurement, ce qui facilite grandement l'utilisation de cette source.

8.4 Premiers tests de fonctionnement

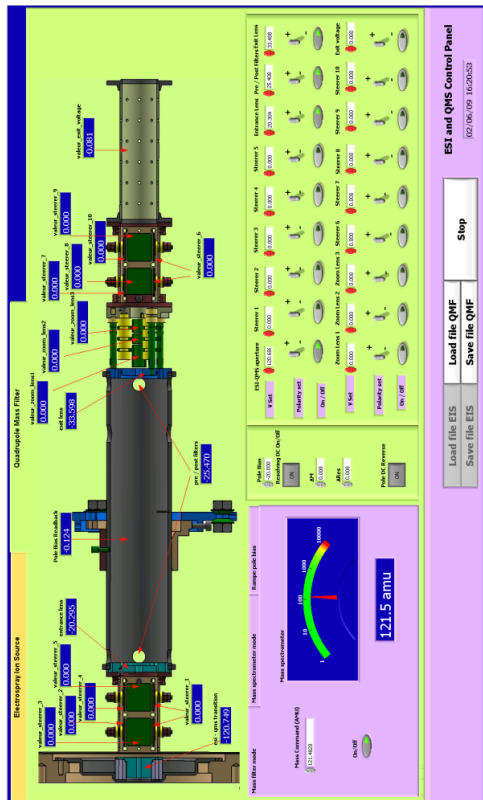
Une phase de tests et de caractérisation a fait suite à la conception et la réalisation de la source electrospray et du quadripôle. L'objectif était de vérifier le bon fonctionnement du système, mais aussi d'appréhender son utilisation dans le cadre de deux thématiques de recherche du groupe : la production de molécules d'intérêts biologiques solvatées et celle d'agrégats d'eau protonnés.

8.4.1 Production de biomolécules isolées et solvatées

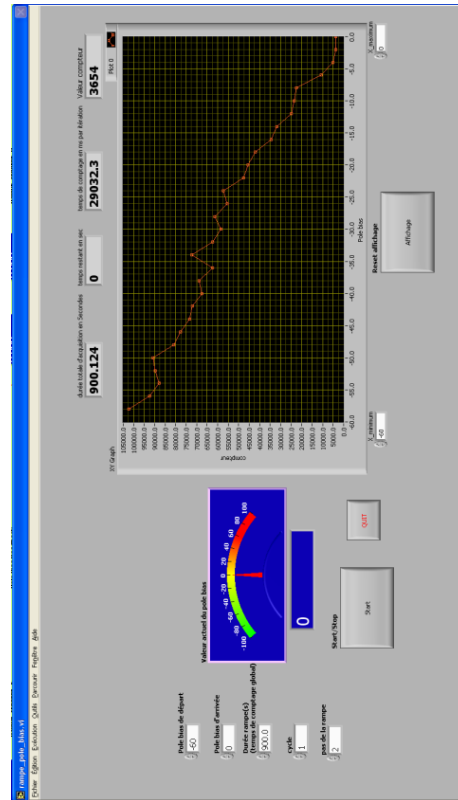
Nous avons procédé à des tests à différentes étapes de l'assemblage du dispositif. Dans un premier temps, le bon fonctionnement de la source a été testé sans système de sélection en masse. Pour cela, nous avons directement installé un channeltron à la sortie de la lentille de Einzel. Bien que ce montage ne suffise pas à l'identification des espèces chargées produites, il permettait de s'assurer qu'un faisceau de particules était guidé à travers les trois étages de la source. Lors de cette première étape, l'objectif recherché était d'obtenir l'intensité maximum sur le détecteur en jouant sur les différents paramètres de l'electrospray et notamment sur le flux de la solution, la haute tension appliquée sur l'aiguille et les polarisations de divers éléments optiques (*Tube lens*, *Pole Bias* de l'octupôle et tensions des lentilles). Pour ces tests, nous avons utilisé la molécule d'adénine dissoute dans une solution de méthanol additionnée d'1% d'acide acétique. Cette molécule est connue pour sa facilité de production avec ce type de technique et s'inscrit, de plus, dans la continuité des études réalisées sur les agrégats de nucléobases. L'optimisation des différents paramètres de la source a permis de constituer un jeu de valeurs de départ sur lequel nous nous sommes appuyées pour les tests du système complet (source electrospray et quadripôle).

La principale difficulté de cette deuxième phase était liée au guidage du faisceau de basse énergie sur l'ensemble du parcours et plus particulièrement dans l'enceinte du quadripôle (40 cm de longueur). Comme précisé dans la partie précédente, nous avons prévu dans le programme Labview la possibilité d'utiliser le quadripôle en tant que guide d'ions sans sélection en masse (mode RF seule). Le détecteur initialement utilisé avec la source electrospray a été monté en sortie du quadripôle. Après quelques jours de recherche et malheureusement en mon absence (conférence IBBI08), l'équipe (merci à Patrick, Michaël, Rémi et Jean-Yves) a obtenu un signal en sortie du dispositif. Le premier spectre de masse a pu être réalisé et j'ai eu le plaisir de le découvrir sur mon téléphone portable grâce à un petit message envoyé par l'équipe. Il est présenté sur la figure 8.8.

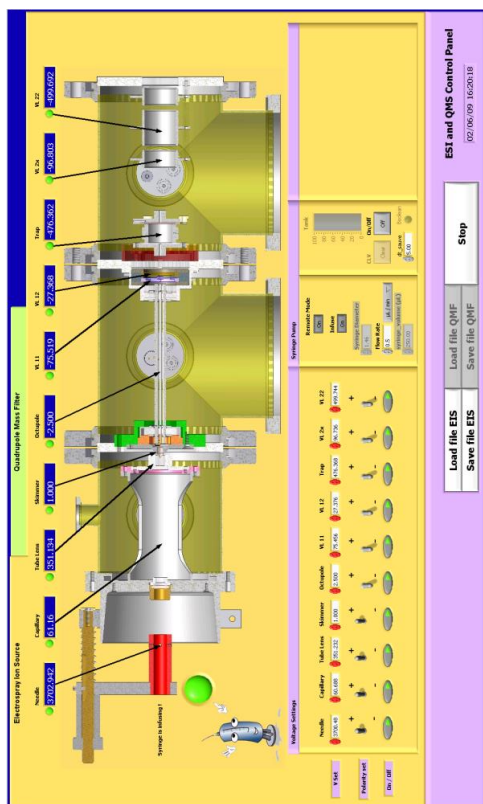
Comme on peut le constater, le nombre de coups par seconde est relativement faible. Après une période d'optimisation des différentes tensions de la source et du quadripôle, nous



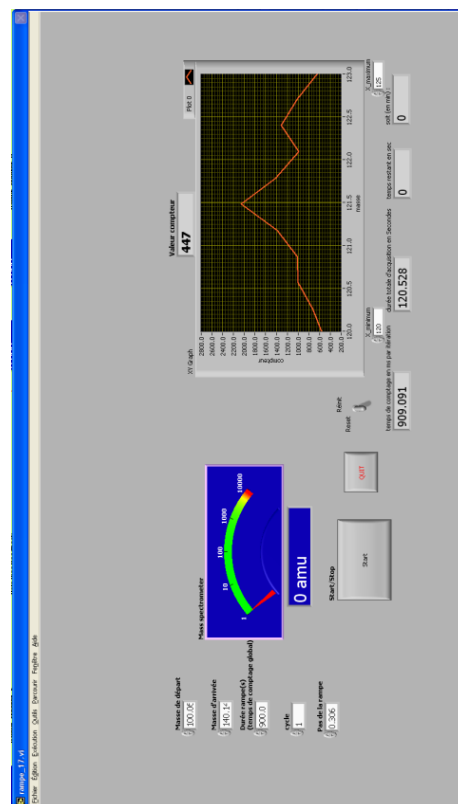
Ecran de contrôle du quadripôle



Fenêtre d'acquisition de la distribution en énergie du faisceau



Ecran de contrôle de la source electrospray



Fenêtre d'acquisition d'un spectre de masse

FIGURE 8.7 – Captures d’écran du programme de commande de la source electrospray et du quadripôle. Le programme a été réalisé en Labview et permet le pilotage complet du dispositif, l’enregistrement des paramètres et l’acquisition de spectres de masse à la sortie du quadripôle.

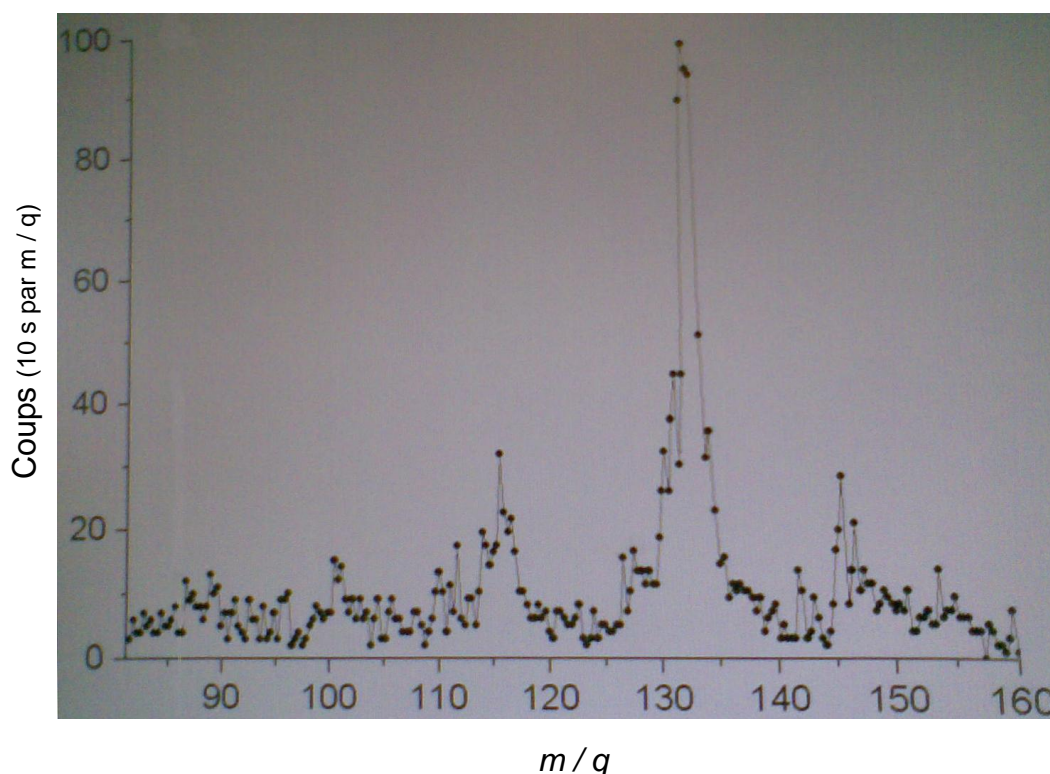


FIGURE 8.8 — Premier spectre de la molécule d'adénine obtenu avec la source electrospray. Le spectre a été photographié et envoyé par téléphone portable alors que j'étais en conférence.

obtenons aujourd'hui une intensité moyenne dans le pic d'adénine de l'ordre de quelques 10^5 coups par seconde.

Après vérification du bon fonctionnement de toutes les commandes du dispositif et leur impact sur la stabilité et l'intensité du faisceau de biomolécules, nous nous sommes focalisés sur la production d'adénine et de thymine solvatées. En particulier, pour une solution donnée, il est légitime de s'attendre à ce que la température du capillaire chauffant soit un élément crucial du processus de désolvatation des biomolécules. Nous avons donc procédé à des études plus systématiques de l'influence de ce paramètre sur la production en phase gazeuse de ces deux systèmes biomoléculaires. La figure 8.9 met en évidence l'effet de la température sur la désolvatation de la molécule d'adénine. Il est ainsi possible de conserver des molécules de méthanol ou d'eau attachées à l'adénine en limitant la température du capillaire chauffant.

Un second exemple est visible sur la figure 8.10 pour la molécule de thymine. Afin de ne pas surcharger le spectre, tous les pics ne sont pas annotés. Comparativement à l'adénine, il est possible de conserver des molécules d'eau attachées à la thymine même à une température plus importante (90°C). À 70°C , on observe aisément des espèces ayant conservées 4 molécules d'eau. Par ailleurs, la molécule de thymine a tendance à s'agréger plus facilement que la molécule d'adénine, comme en témoigne la présence, pour les deux températures, de l'espèce $[\text{Thy}_3+\text{H}]^+$.

Enfin, l'influence de la température a également été testée à partir d'une solution

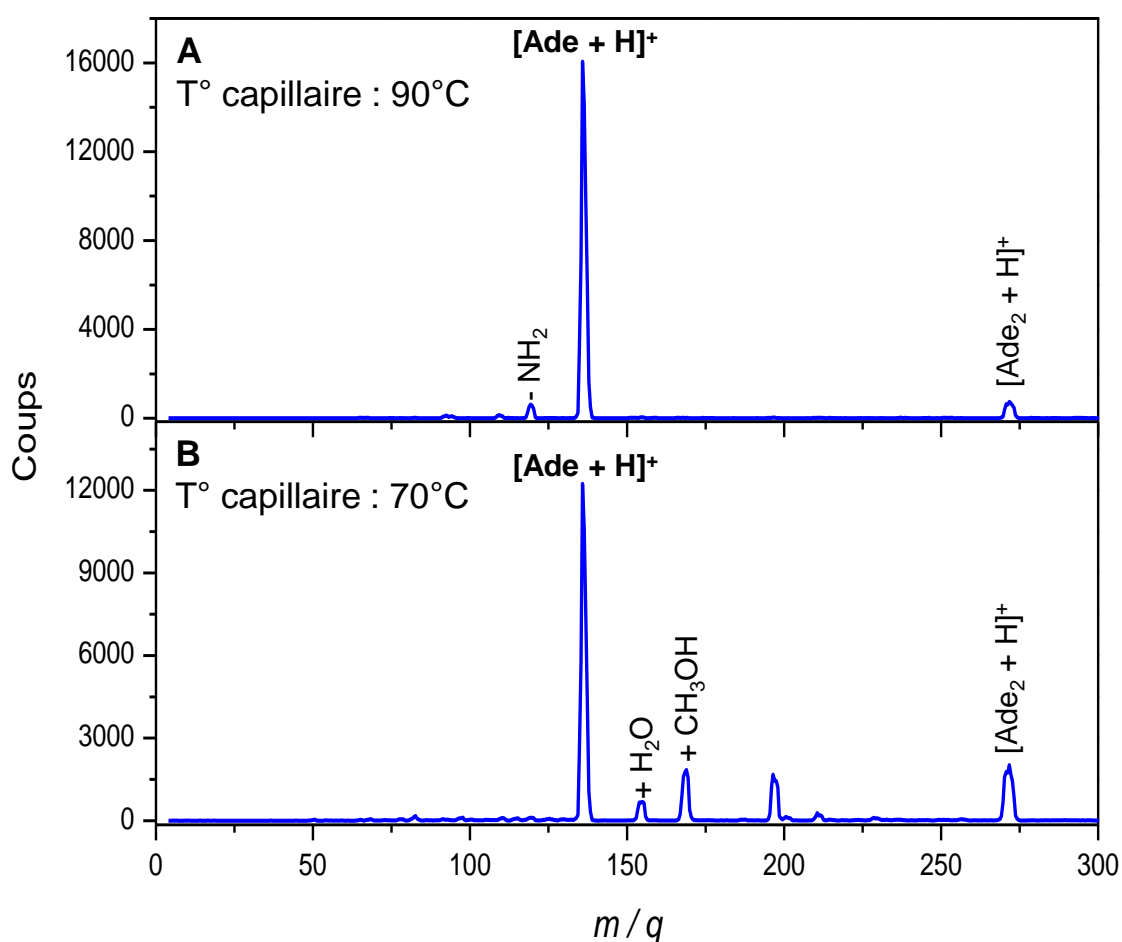


FIGURE 8.9 – Effet de la température du capillaire chauffant sur la désolvation de l'adénine dans une solution de méthanol additionnée d'1% d'acide acétique.

contenant un mélange équimolaire des deux molécules adénine et thymine. L'objectif d'une telle expérience était de voir si la conservation de l'appariement (voir chapitre 5 sur les agrégats mixtes, page 114) entre les molécules pouvait être observé en phase gazeuse après évaporation du solvant. Les résultats du spectre de masse réalisée sont présentés sur la figure 8.11. La présence d'espèces telles que $[\text{Thy} + \text{Ade} + \text{H}]^+$ ou $[\text{Thy}_2 + \text{Ade} + \text{H}]^+$ confirme le fait que les deux molécules établissent des liaisons en solution qui sont conservées dans le processus electrospray. La prépondérance du dimère mixte $[\text{Thy} + \text{Ade} + \text{H}]^+$ et celle du trimère mixte $[\text{Thy}_2 + \text{Ade} + \text{H}]^+$ semble également indiqué que le germe d'agrégation de ces systèmes provient de l'appariement initial de la molécule d'adénine avec la molécule de thymine et ce, indépendamment de la température du capillaire. *A contrario*, l'intensité des agrégats purs d'adénine semblent dépendre plus directement de ce paramètre (voir la comparaison du pic d' $[\text{Ade}_2 + \text{H}]^+$ à 70 et à 90°C). Ces premiers résultats obtenus lors des tests laissent penser qu'il y a formation initiale d'une paire adénine/thymine, particulièrement stable, sur laquelle s'agrégeraient les molécules de thymine. En particulier le fait que la molécule de thymine ait une tendance plus forte à s'agréger (voir figure 8.10) tendrait à expliquer la présence évidente de l'espèce $[\text{Thy}_2 + \text{Ade} + \text{H}]^+$ sur les deux

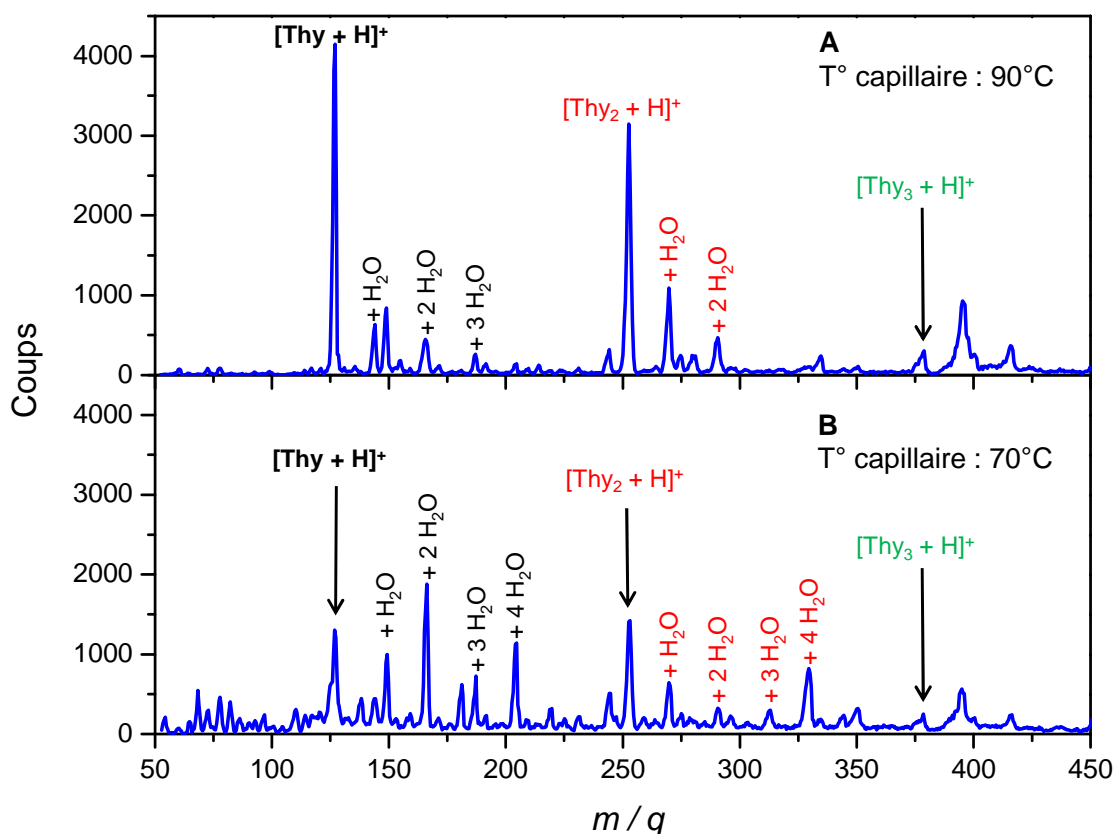


FIGURE 8.10 – Effet de la température du capillaire chauffant sur la désolvation de la thymine dans une solution de méthanol additionnée d'1% d'acide acétique. Remarquons que le nombre de molécules d'eau restant attachées à la thymine est beaucoup plus important que dans le cas de l'adénine.

spectres. Ces observations restent à confirmer et à interpréter plus finement. Il est, par exemple, envisageable de comparer ces résultats avec des calculs de chimie quantique sur la structure de ces édifices, en prenant en compte la température.

À partir des fonctionnalités du programme de pilotage du quadripôle, que j'ai développé, il est aussi possible de déterminer l'énergie cinétique du faisceau et sa dispersion. Pour cela, comme expliqué précédemment, le principe consiste à faire varier le *Pole Bias* jusqu'à couper complètement la transmission du faisceau. En prenant la dérivée du signal obtenu, on peut en déduire simplement les grandeurs physiques recherchées. Nous avons réalisé deux mesures à deux températures différentes (60 et 100°C). Elles sont présentées sur la figure 8.12. Le faisceau d'adénine, sur lequel nous avons effectué cette expérience, possède une énergie cinétique moyenne de $8,4\text{ eV}$. À cet égard, nous avons remarqué que cette valeur était approximativement égale à la valeur de l'*offset* appliquée sur les barres de l'octupôle ⑥ de la source electrospray. On peut ainsi supposer que les derniers processus d'évaporation et la formation de biomolécules complètement désolvatées se produisent dans l'octupôle. Ceci expliquerait la dépendance très forte entre l'*offset* de l'octupôle et l'énergie cinétique des particules formées en phase gazeuse.

Enfin un dernier test a permis de vérifier la possibilité de produire des espèces fortement

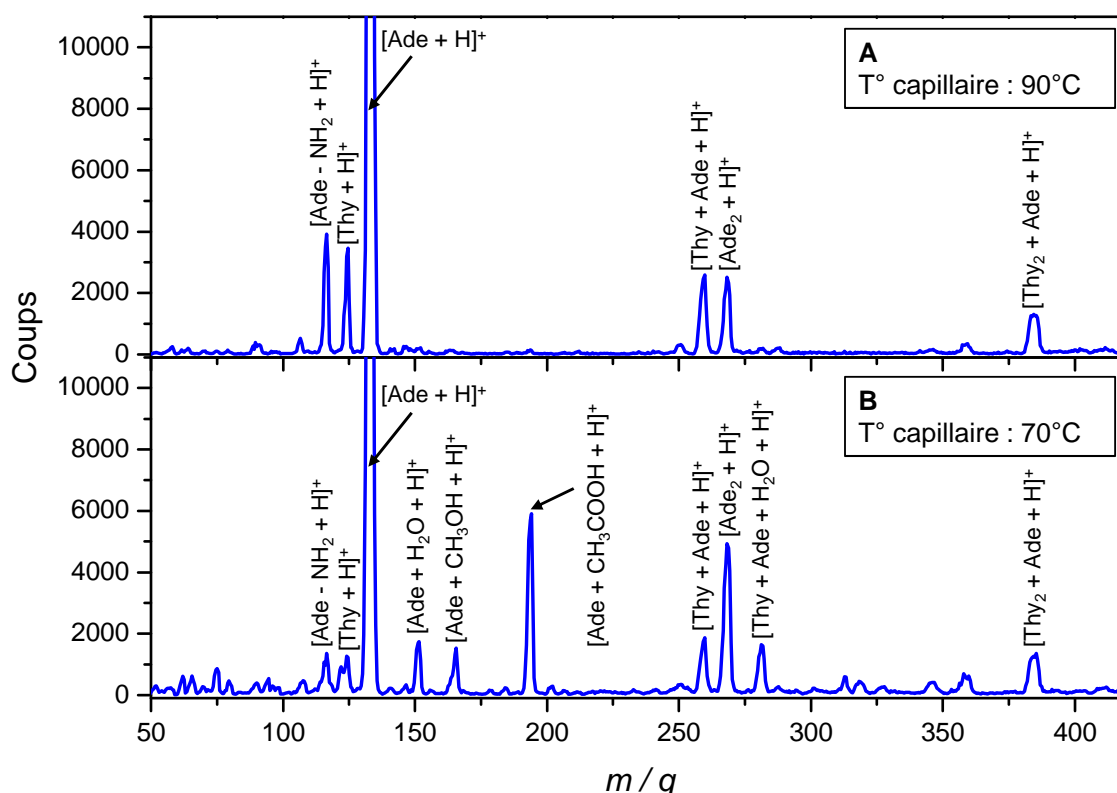


FIGURE 8.11 – Spectre obtenu à partir d’une solution équimolaire d’adénine et de thymine. On note l’influence de la température du capillaire chauffant sur l’intensité de production des différentes espèces.

multichargées avec ce nouveau dispositif [162]. Ainsi, le spectre 8.13 montre la distribution des états de charge de la protéine BSA (*Bovine Serum Albumin*) qui comporte 583 acides aminés pour une masse de 66430 u.m.a.. Par ajout d’une quantité variable d’acide dans une solution composée initialement de 90% de méthanol et de 10% d’eau, cette molécule peut être produite dans une large gamme d’états de charge. Dans le cas présent, la protéine fortement protonnée est produite dans des états compris entre 25 et 55 charges. Dans le cadre de la collaboration avec le Danemark, nous avons tenté de réaliser une expérience dans laquelle nous souhaitions étudier l’influence de l’état de charge de la molécule sur les voies de dissociation induites par collisions avec des atomes de gaz rare. L’idée était de produire trois états de charges bien séparés ($q = 10, 30, 50$ par exemple) et d’observer d’éventuelles modifications des voies de fragmentation de la molécule. Malheureusement, l’expérience n’a pas été concluante à cause de problèmes de stabilité dans production des différents états de charge de la biomolécule.

L’ensemble des premiers résultats présentés dans cette partie met en évidence le potentiel de la source electrospray et du dispositif de sélection en masse, qui a été développé pendant cette thèse. Bien qu’il reste encore un important travail de caractérisation pour contrôler précisément la solvation des biomolécules, la reproductibilité des résultats obtenus lors de ces premiers tests, permet d’envisager dans un futur proche des études de collisions entre ions et biomolécules environnées. Ces expériences et les études d’optimisa-

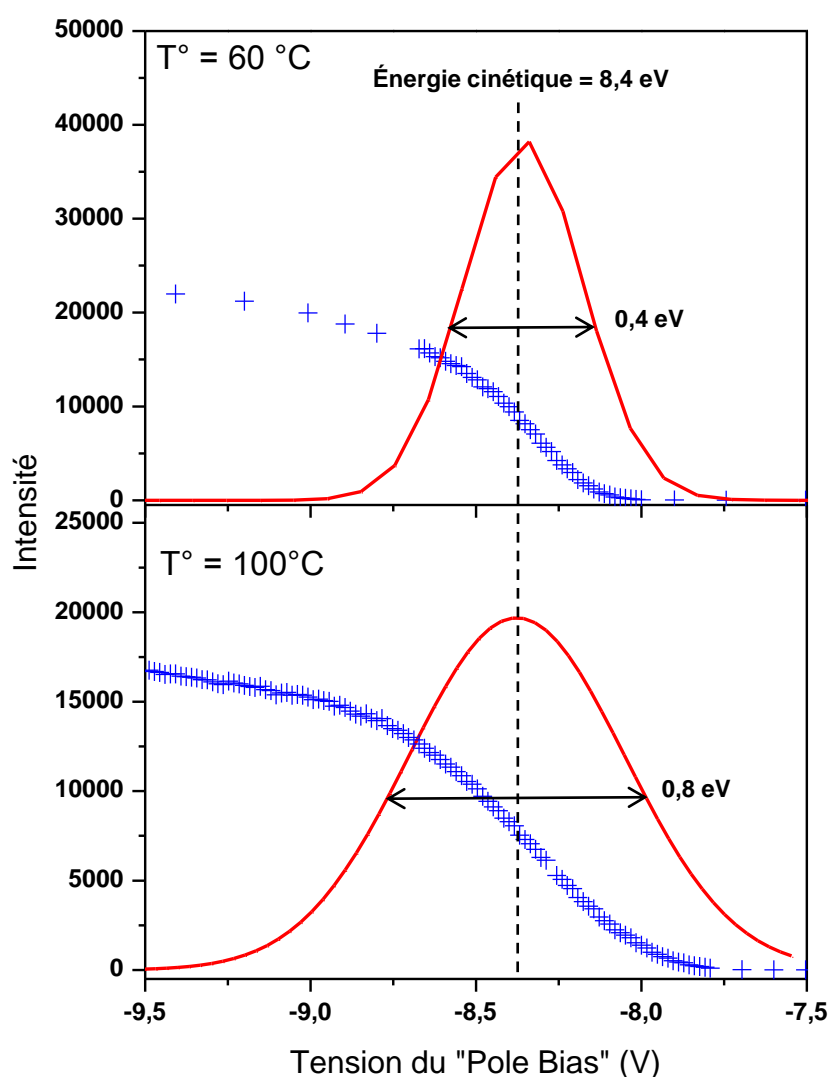


FIGURE 8.12 — Mesure de l'énergie cinétique d'un faisceau d'adénine pour deux températures différentes. L'expérience a été réalisée avec une température du capillaire chauffant de 60 °C (en haut) et de 100 °C (en bas). La dispersion en énergie est déterminée à partir de la largeur à mi-hauteur de la dérivée du signal mesuré.

tion et d'amélioration font et feront l'objet de la thèse de Michaël Capron, qui a débuté en septembre 2008.

8.4.2 Production d'agrégats d'eau protonnés

Dans le cadre des premiers tests de caractérisation de la source electrospray, nous avons également testé la possibilité de former des agrégats d'eau protonnés sélectionnés en taille. L'étude de la production de tels systèmes est motivé, entre autres, par le fait que ces agrégats constituent les modèles en phase gazeuse du proton solvaté en phase liquide [163,164]. La caractérisation de la structure de cet ion est d'autant plus importante que les réactions acido-basiques en solution sont parmi les réactions chimiques les plus universelles qui soient. Les recherches sur ces agrégats s'expliquent également par leur importance dans la physique de l'atmosphère, en astrophysique et bien sûr en biologie. On

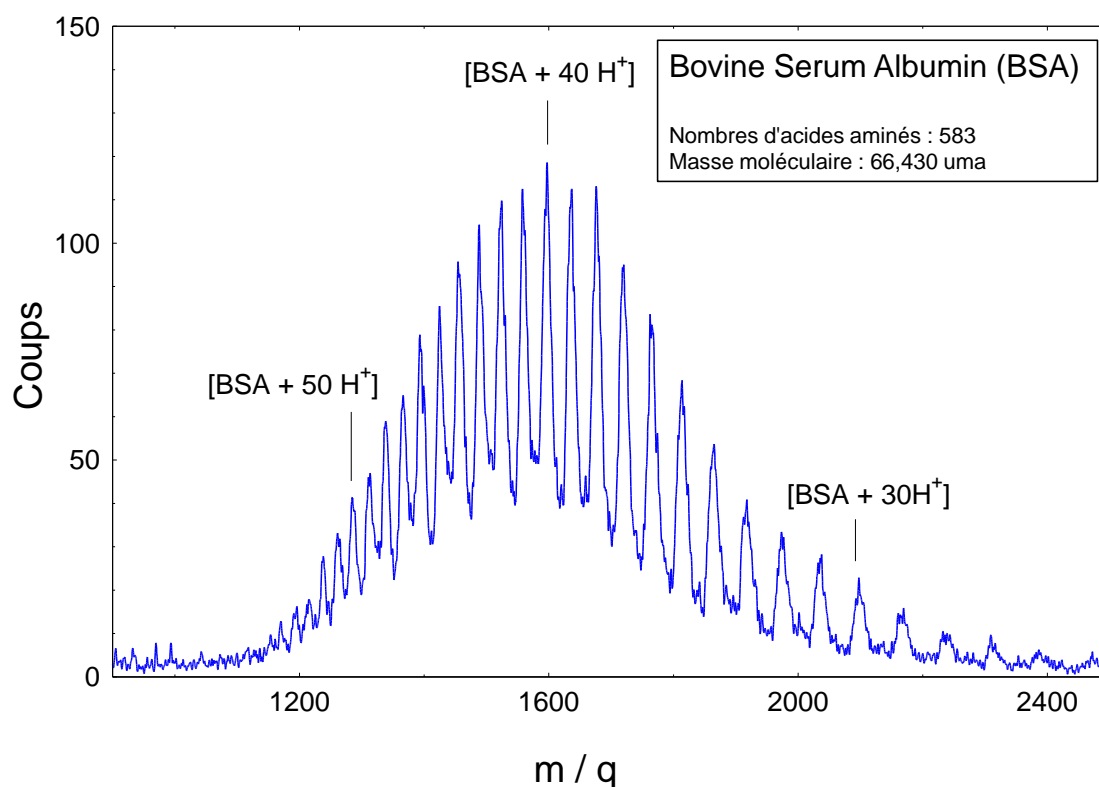


FIGURE 8.13 – Formation de protéines de BSA multichargées mettant en évidence la production de biomolécules dont l'état de charge q varie entre 25 et 55. La source electrospray permet la formation en phase gazeuse d'espèces multiement chargées, ce qui réduit le rapport m/q et permet d'utiliser les techniques habituelles de spectrométrie, même lorsque la masse atteint plusieurs dizaines de milliers de Dalton (ou u.m.a.).

peut, par exemple, citer le cas des réactions enzymatiques, où interviennent de nombreux échanges de protons ; la molécule d'eau jouant alors un rôle de catalyseur en devenant un accepteur de proton [165]. Il n'est donc pas étonnant que ces systèmes reçoivent une attention grandissante tant d'un point de vue expérimental que théorique.

S'agissant d'une thématique de recherche du groupe, un sujet de thèse a débuté fin 2008, avec la volonté d'utiliser la source electrospray comme outil de formation des agrégats d'eau sélectionnés en taille. Cette méthode de production s'inscrit dans la continuité d'études antérieures, portant sur des agrégats neutres produits par une technique du jet supersonique.

Depuis les cinq dernières années, des calculs de chimie quantique [166,167], couplés à la spectroscopie infra-rouge d'agrégats protonnés sélectionnés en masse ont permis d'étudier plus finement la structure de cœur de tels agrégats [168–170]. Il a été montré que ce cœur pouvait être constitué de deux structures différentes. D'une part, une structure dite « Eigen » correspondant à l'ion hydronium H_3O^+ , dans lequel le proton est lié à une seule molécule d'eau ; d'autre part, une structure dite « Zundel » $\text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}^+ \cdots \text{OH}_2$, dans laquelle le proton est partagé entre deux molécules d'eau [171].

Dans ce contexte, les ions multichargés peuvent être utilisés comme une sonde originale de ces systèmes. L'ouverture de nouvelles voies de fragmentation, suite à la collision avec des agrégats d'eau de taille sélectionnée, pourrait ainsi permettre d'obtenir des informations complémentaires sur leur structure.

En pratique, la production d'agrégats d'eau avec la source electrospray nécessite une modification du dispositif. Bien qu'il soit *a priori* possible de les produire à partir d'un spray d'eau, le faisceau obtenu est généralement très instable. En particulier, le fait que la tension de surface de l'eau soit grande (73 mN/m à 20 °C), comparativement au méthanol (22,6 mN/m à la même température), nécessite d'utiliser des tensions sur l'aiguille plus importantes pour accéder à un cône de Taylor stable. Ceci engendre une plus grande instabilité à cause de la création de décharges électrochimiques. La technique de production, que nous avons utilisée, mise en évidence en 1966 [172], consiste à remplacer l'aiguille creuse du spray par une pointe très fine au bout de laquelle est créée une décharge de type couronne [173]. Les molécules d'eau présentes dans l'atmosphère vont alors s'agréger autour de noyaux de nucléation (par exemple l'espèce NO_3^- voir [174]). Les mécanismes, qui conduisent à la formation d'agrégats d'eau par décharge couronne, sont encore aujourd'hui largement discutés.

Dans les premières expériences que nous avons réalisées, nous avons utilisé des pointes en tungstène. La méthode de production de ces pointes est largement connue des utilisateurs de microscopes STM [175]. Il s'agit de produire une électrolyse dans une solution à 1 mol/L de KOH. L'application d'un courant alternatif (fréquence : 400 Hz et amplitude crête à crête de 10 V) entre le barreau de tungstène (3 mm de diamètre) et une contre-électrode en acier inoxydable conduit à une attaque électrochimique du tungstène et à la formation d'une pointe très fine lorsque le ménisque, formé par la solution au contact du barreau, se brise. La fabrication de ces pointes est illustrée sur la partie droite de la figure 8.14. La partie gauche de cette figure montre la modification technique réalisée en vue de produire une décharge couronne à pression atmosphérique. L'agrandissement de la zone inter-électrodes présente une décharge couronne en cours. La couleur bleue-violette est caractéristique du phénomène.

En plaçant la pointe à une distance de 10,2 mm de l'entrée du capillaire chauffant (température de 35 °C) et en appliquant une tension de +7,58 kV (l'intensité mesurée est alors de 22 μA), on obtient le spectre de la figure 8.15. Il est possible de former de cette façon des agrégats de grandes tailles (jusqu'à 110 molécules d'eau). On observe également l'apparition de nombres magiques (pour des tailles $n = 6, 21, 30$), qui correspondent à des agrégats dont la structure est particulièrement stable. Dans les différents essais que nous avons menés, nous avons toujours remarqué la présence renforcée de l'agrégat $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_{21}$. L'apparition des nombres magiques $n = 6$ et $n = 30$ est, par contre, moins systématique et semble dépendre des conditions de réalisation de l'expérience.

Avec la même démarche que celle engagée avec les molécules biologiques, nous avons également étudié l'influence de la température du capillaire chauffant sur le spectre de formation des agrégats d'eau protonnés. L'évolution de la distribution des agrégats d'eau

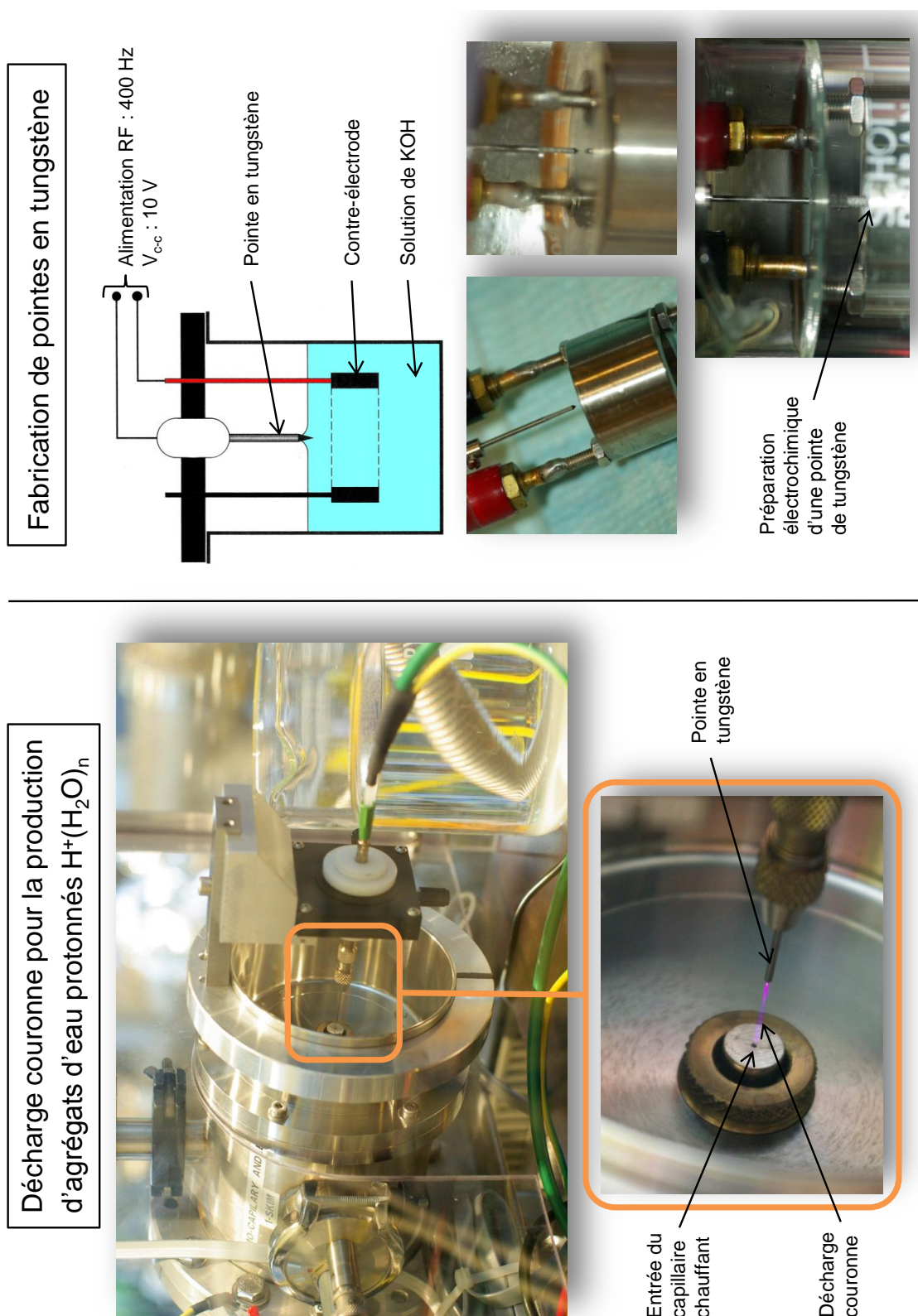


FIGURE 8.14 – Dispositif utilisé pour la production d'agrégats d'eau protonnés de la forme $H^+(H_2O)_n$. Le principe consiste à créer une décharge couronne entre une pointe de tungstène et l'entrée du capillaire chauffant de la source electrospray. La fabrication de la pointe est réalisée à partir d'un barreau de tungstène par une réaction électrochimique dans une solution de KOH.

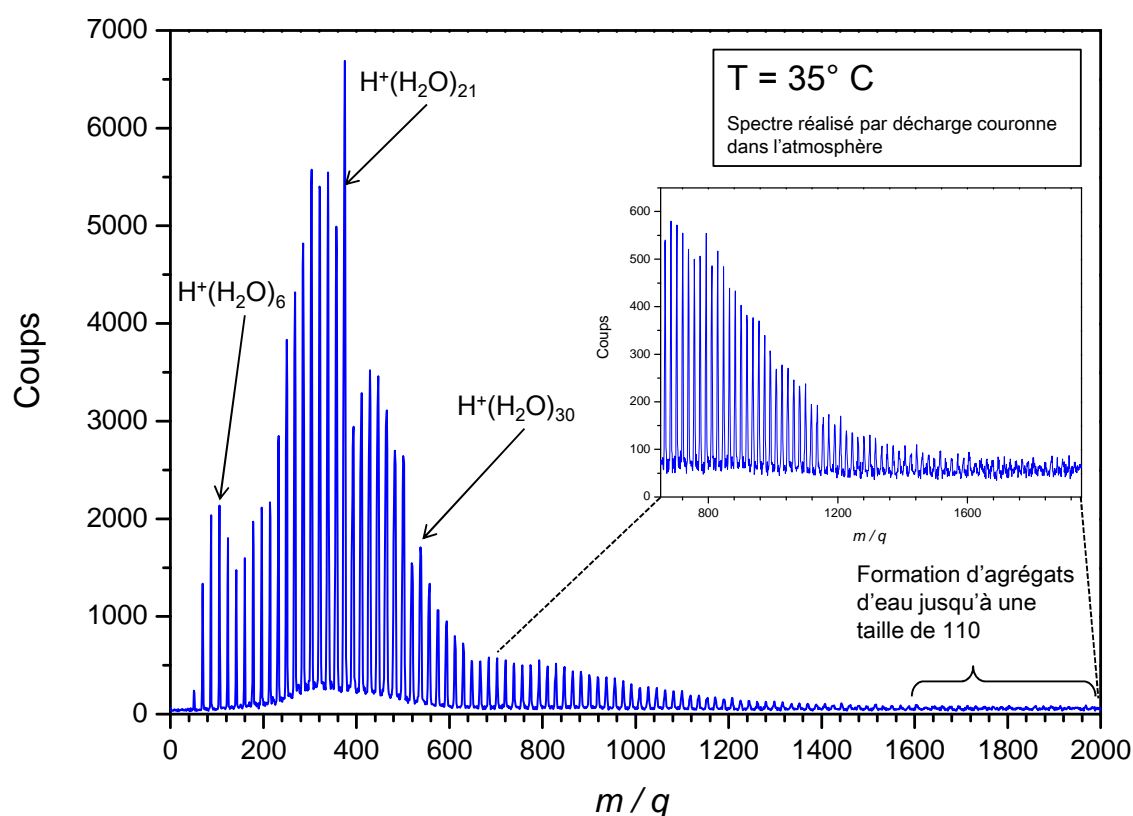


FIGURE 8.15 — Spectre d'agrégats d'eau protonnés de formule $H^+(H_2O)_n$ réalisé en mode décharge couronne. La température du capillaire chauffant est fixée à 35°C .

protonnés en fonction de ce paramètre est représentée sur la figure 8.16. Chaque spectre est normalisé à l'intensité du pic le plus intense. De façon à visualiser clairement les effets sur les agrégats de taille moyenne, les spectres sont volontairement limités au rapport $m/q = 595$, ce qui correspond à des agrégats de taille 33. À faible température, une distribution régulière d'agrégats est obtenue avec formation de tailles supérieures à 20. L'existence des nombres magiques $n = 4$ (bien plus courante que la structure $n = 6$ évoquée précédemment) et $n = 21$ est également bien évidente [176, 177]. Au fur et à mesure de l'augmentation de la température du capillaire, on observe un déplacement de la distribution au profit de petits agrégats. La disparition des plus gros agrégats est clairement visible pour les températures 50 , 55 et 60°C .

En conclusion, ces résultats préliminaires permettent d'optimiser l'intensité de production des espèces en fonction de la température du capillaire chauffant. Si l'on souhaite obtenir des agrégats de petites tailles, on prendra soin d'atteindre une température de l'ordre de 50 - 60°C . À l'inverse la production de gros agrégats exige de diminuer notablement la température. La qualité de la pointe n'a pas semblé être cruciale lors de ces premiers tests. Par exemple, nous avons parfois eu recours à des aiguilles à coudre sans que cela n'ait d'incidence sur le spectre de distribution en taille. Ceci étant, nous avons toujours cherché à optimiser la transmission des espèces plutôt que la résolution du spectre. Il est très vraisemblable qu'une amélioration significative de la résolution du quadripôle

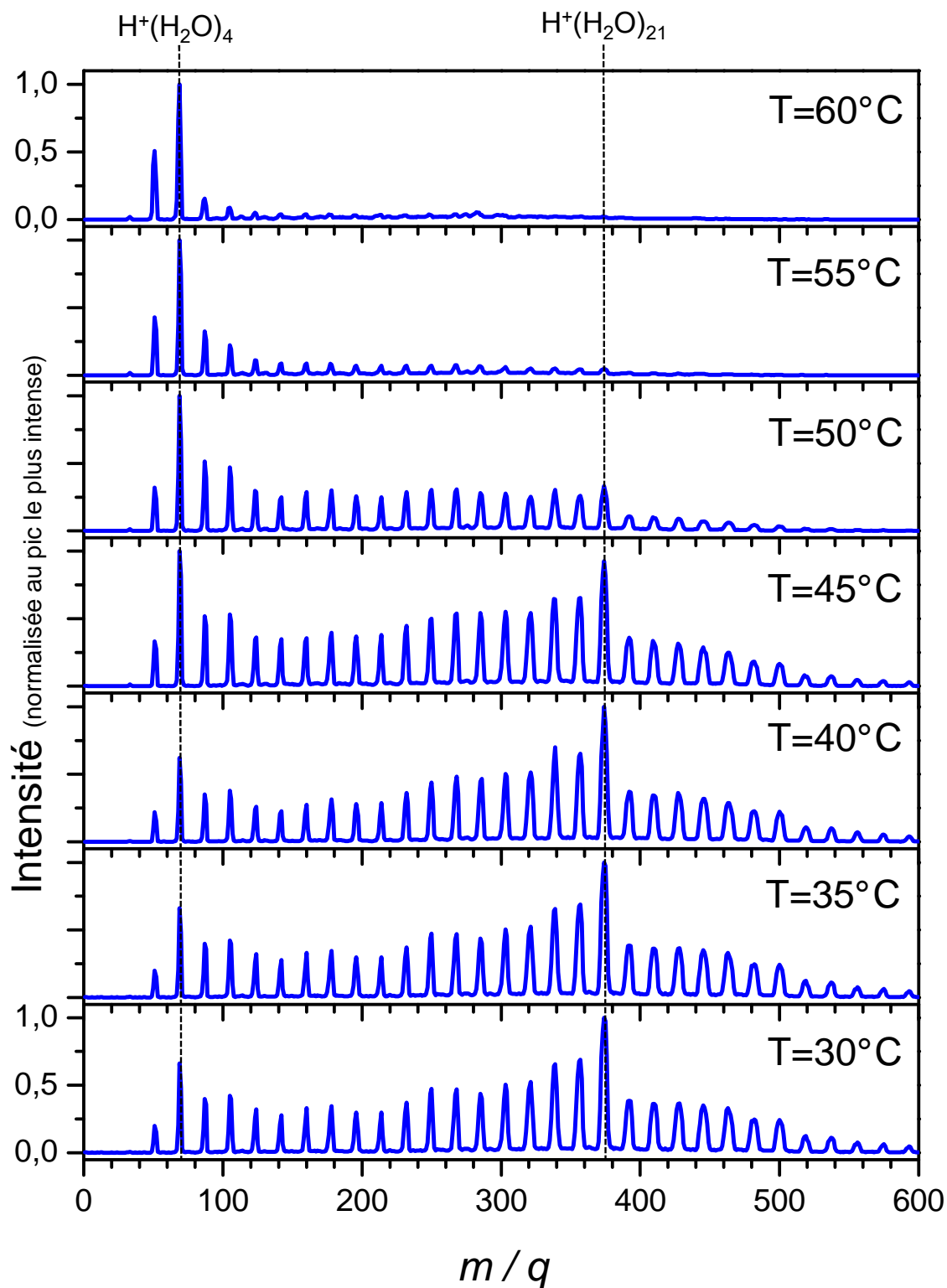


FIGURE 8.16 — Influence de la température du capillaire chauffant sur la distribution des agrégats d'eau de type $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ en mode de décharge couronne. L'intensité est normalisée à celle du pic le plus intense de chaque spectre.

conduise à mettre en évidence des effets liés à la qualité de la pointe. Enfin, les spectres visibles dans les références précédemment citées tendent à montrer qu'il est possible de déplacer la distribution en taille vers les très gros agrégats en jouant notamment sur les éléments optiques de guidage de la source electrospray. Dans ce sens, la tension appliquée sur le *Tube Lens* est un paramètre de première importance. Le cumul d'une pression (de l'ordre de quelques mbar) et d'un champ électrique fort dans cette région conduit probablement à une fragmentation des plus gros agrégats d'eau (ce phénomène est appelé *in-source CID* [178]).

8.5 Optimisation du fonctionnement : perspectives

Les résultats des tests de fonctionnement de la source electrospray, associés à des recherches bibliographiques sur les différents problèmes rencontrés lors de cette phase de mise en route, permettent de faire le point sur les possibilités d'évolution et d'amélioration du dispositif expérimental que j'ai développé. Sans prétendre à l'exhaustivité, cette partie se veut à la fois un bilan des connaissances pratiques acquises sur le sujet mais également une recueils de conclusions importantes, issues de travaux fondamentaux portant à la fois sur la partie instrumentale, sur les caractéristiques de l'analyte et sur l'importance du solvant [146, 153, 159, 179].

8.5.1 Amélioration instrumentale

Sensibilité et transmission des ions

L'une des problématiques majeures dans le cadre des expériences de collisions entre des biomolécules et des ions multichargés est liée à la faible intensité des faisceaux d'ions produits, d'une part par la source electrospray, et d'autre part, par la source ECR. L'optimisation de l'intensité de la source ECR sortant du cadre de cette thèse, nous nous focalisons sur les améliorations instrumentales possibles de la source electrospray. Nous nous intéressons dans un premier temps à la sensibilité et à la transmission des ions dans ce type de dispositif.

Par sensibilité, nous entendons l'efficacité avec laquelle les biomolécules sont converties en ions en phase gazeuse, mais aussi l'efficacité avec laquelle les ions sont transportés à travers les différents étages du dispositif expérimental avant d'être détectés. Bien que ce sujet soit toujours largement débattu, il apparaît que le facteur qui limite le plus cette efficacité n'est pas le processus d'ionisation, mais bel et bien le transfert des ions à travers la source et le spectromètre [180, 181]. La transmission dépend à la fois de la qualité de l'optique ionique utilisée et du type d'analyseur en masse utilisé. On peut estimer que le processus de transfert des espèces chargées produites en phase gazeuse conduit à une perte de quelques 4 à 5 ordres de grandeur [180]. Toutefois, il reste difficile de préciser ces valeurs, car le nombre d'ions produits dans le spray n'est pas directement mesurable. Dans notre cas, les tests réalisés ont mis en évidence le fait qu'une partie importante des pertes intervient au niveau du deuxième étage de la source, où l'on a recours à un octupôle pour

guider les ions. La pression y reste particulièrement élevée (quelques 10^{-3} mbar), de fait le fonctionnement du guide d'ions n'est pas optimal. Dans le but d'introduire un maximum d'ions dans l'appareil de sélection en masse, l'équipe de Smith a mis au point, en 1997, un dispositif optique particulièrement efficace à haute pression appelé « *ion funnel* » [182]. Il consiste en de multiples électrodes de diamètres décroissants sur lesquelles sont appliquées des tensions radio-fréquences de l'ordre de quelques kHz [183–186].

Une autre initiative intéressante a conduit l'équipe de Kim [187] à installer un capillaire chauffant constitué de plusieurs trous d'entrée, à l'inverse de celui que nous utilisons (d'origine Thermo Finnigan) qui n'en comporte qu'un. Le couplage de ce capillaire multiple et d'un funnel a permis d'obtenir une transmission des ions 20 fois supérieure à la configuration actuelle de notre source ESI.

Outre la possibilité de jouer sur le transport optique, une autre voie d'optimisation de l'instrument est également envisageable. Il s'agit de chercher à augmenter directement le nombre de biomolécules chargées lors de la production du spray. L'une des idées qui vient à l'esprit est d'augmenter la concentration de l'analyte dans la solution. Rapidement, toutefois, il a été mis en évidence que la réponse de l'ionisation par électrospray atteint une limite supérieure avec des solutions fortement concentrées en analyte (de l'ordre de 10^{-4} , 10^{-5} mol/L) [180,188]. Différentes explications de cette saturation ont été proposées, mais deux idées semblent actuellement faire consensus. La première a été proposée par Encke [189] et part du principe qu'il existe un excès de charges fixe sur les gouttelettes formées par le spray au niveau du cône de Taylor. Par analogie avec la concentration de biomolécules dans la solution, on peut définir une concentration d'excès de charges qui correspond à la différence entre la concentration en cations et celle en anions de la solution. Lorsque la concentration en analyte dépasse la concentration en excès de charges, on atteint la limite de la réponse de l'électrospray. Il apparaît ainsi une limitation de charges.

La seconde [190] prend en compte le fait qu'il existe un espace limité à la surface des gouttelettes. Lorsque la concentration de biomolécules est trop importante, les gouttelettes sont complètement saturées en surface. L'éjection d'espèces ioniques est donc limitée, parce que l'excédent de biomolécules qui ne peut se retrouver en surface, est confiné à l'intérieur de la gouttelette. Sur la base de calculs, Bruins [191] a montré que si une solution de 10^{-5} mol/L est utilisée, la surface des gouttelettes est complètement saturée après quelques étapes d'évaporation successives. Quoiqu'il en soit, la limitation de la réponse des sources électrospray est très certainement due à la fois à des facteurs instrumentaux et à des contraintes intrinsèques liées à la capacité de production de biomolécules chargées. Récemment, une méthode originale a été proposée par l'équipe de Tang [192] qui a implémentée un système comportant de multiples aiguilles créant ainsi lors du fonctionnement de la source 9 cônes de Taylor stables et augmentant ainsi la production d'ions biomoléculaires d'un facteur 3.

Un design optimisé de la source, à même de délivrer des intensités compatibles avec les futures expériences de collisions entre biomolécules et ions multichargés, pourrait donc être constitué des éléments suivants. Au niveau de la génération du spray, d'une matrice de

pointes conductrices à partir desquelles seraient formés simultanément plusieurs cônes de Taylor. Dans le premier étage du pompage différentiel, d'un capillaire chauffant possédant plusieurs trous d'entrée de façon à transmettre un maximum d'ions générés par le spray dans l'étage suivant. Enfin avant l'octupôle, devrait être ajouté un funnel sur la base de celui proposé par l'équipe de Smith. On peut, de plus, penser à augmenter le diamètre du diaphragme assurant la jonction entre la source electrospray et le quadripôle et à réduire sa longueur, si cela ne dégrade pas le vide dans l'enceinte du quadripôle. Avec ces modifications, il est envisageable de multiplier l'intensité de production des molécules d'intérêt biologique d'un voire deux ordres de grandeur.

Stabilité du spray

Comme nous l'avons détaillé dans la partie précédente, le spray de la source est stable lorsque le cône de Taylor possède une forme constante et qu'un jet continu de gouttelettes s'en échappe. En général, on cherche toujours à se placer dans le régime de la figure 8.3-C, pour lequel le courant de la source est bien reproductible. Différents facteurs vont influencer sur la stabilité de ce mode lors de l'opération. La stabilité de la haute tension appliquée sur l'aiguille est particulièrement importante ainsi que le contrôle du flux par le pousse-seringue. La viscosité et la constante diélectrique de la solution joue également un rôle majeur dans la stabilité du faisceau de biomolécules produit. Pour ce qui nous concerne, les tests réalisés ont mis en évidence la qualité de l'alimentation haute tension ainsi qu'une maîtrise de la constance du flux tout à fait satisfaisante. Pourtant, il est fréquent que le faisceau se dégrade au cours du temps. Généralement, il suffit de retoucher légèrement certains paramètres du guidage ionique pour retrouver les conditions initiales. Toutefois, l'intervention nécessite parfois l'arrêt du spray et la formation d'un nouveau cône de Taylor. Ce problème récurrent provient certainement de l'altération du mode de fonctionnement de la source (passage intermittent au mode de cône pulsé). À cause d'un effet d'hystérésis, il n'est pas possible de retrouver proprement le mode du cône de Taylor stable. Vertes et ses collaborateurs [159] ont proposé d'utiliser un système de contrôle actif de la tension appliquée sur l'aiguille sur la base d'un diagnostic effectué par une méthode d'analyse optique du jet. Le principe de visualisation du spray a l'énorme avantage de pouvoir identifier les changements de direction du spray (éjection hors axe) qui signe les prémices d'une dégradation du mode. Un tel système reste cependant lourd à mettre en œuvre et particulièrement onéreux. Le développement d'un tel système à boucle de contre-réaction ne peut se justifier que lorsque la nécessité de ne pas couper le faisceau est impérative.

Nous n'avons jusqu'ici considéré que des problèmes liés au fonctionnement même de l'appareil sans faire état des modifications susceptibles de provenir de l'extérieur. Il faut, en effet, garder à l'esprit que la formation du spray se fait à la pression atmosphérique et que les conditions extérieures telles que la température, l'humidité et autres perturbations vont jouer un rôle non négligeable dans l'évolution du comportement du spray. Une façon de minimiser l'impact de ces conditions, outre un meilleur confinement de la zone du cône

de Taylor, est de laisser au système une certaine latitude pour qu'il puisse s'adapter aux modifications éventuelles. On peut par exemple avoir recours à un système qui ajuste automatiquement le flux de la solution qui arrive à l'aiguille. Cet auto-ajustement peut-être réalisé au moyen d'un tube de faible section qui contient la solution et qui est relié à l'aiguille. Le bout de ce tube est laissé ouvert et aucune force supplémentaire n'est utilisée pour pousser la solution. La formation du cône de Taylor va alors aspirer la solution à un flux optimal qui assure un fonctionnement continu du processus. Ce procédé est aujourd'hui couramment utilisé avec les sources de type nanospray [193].

Un autre moyen d'action consiste à permettre une sorte d'auto-ajustement de la haute tension qui alimente l'aiguille. Pour cela, il suffit de placer une résistance de l'ordre de $R = 10 \text{ G}\Omega$ entre l'alimentation haute tension et le contact au niveau de l'aiguille. En effet, avec ce dispositif, la différence de potentiel créée entre l'aiguille et l'entrée du capillaire chauffant V_{spray} est égale à $V_{\text{HT}} - Ri$, où V_{HT} est la haute tension fournie par l'alimentation et i l'intensité qui traverse la résistance R . Comme l'intensité du courant circulant dans le circuit est de l'ordre de 100 nA, le montage permet un ajustement automatique de la tension V_{spray} . En effet, lorsque la génération de charges diminue au niveau du spray, l'intensité i diminue de même que la tension Ri qui traverse la résistance. Puisque V_{HT} est constante, la tension V_{spray} augmente ce qui permet de contrebalancer l'effet. Des améliorations très significatives de la stabilité et une réduction notable de la formation d'arcs ont été observées par différents groupes [194, 195] avec cette simple modification.

8.5.2 Sensibilité d'une electrospray en fonction de la biomolécule

De nombreuses études fondamentales portant sur les processus de fonctionnement des sources electrospray s'intéressent à la dépendance des caractéristiques de l'analyte vis-à-vis de la réponse du processus d'electrospray. Ce type de recherche est d'autant plus pertinent que la réponse des electrosprays change significativement d'une biomolécule à l'autre alors que la solution utilisée pour diluer la poudre est identique [196, 197]. Ainsi une meilleure compréhension du comportement des biomolécules dans le processus d'electrospray est indispensable dans la perspective d'une optimisation fonctionnelle du dispositif. Dans cet objectif, nous nous intéressons ici au chargement de l'analyte qui intervient à différents niveaux et nous discutons les aspects liés à l'activité surfacique des biomolécules qui semblent jouer un rôle prépondérant dans l'efficacité de production des ions biomoléculaires en phase gazeuse.

Processus de chargement de l'analyte

Il existe essentiellement trois voies d'ionisation dans le processus d'electrospray qui vont conduire à des espèces biomoléculaires chargées. La première trouve son origine dans la solution où l'analyte existe déjà sous forme ionique. La séparation de charge qui intervient ensuite au niveau du cône de Taylor permet, par la création de gouttelettes, la formation en phase gazeuse des ions qui portent l'excès de charge. Ainsi la séparation des charges constitue la première méthode grâce à laquelle les biomolécules, qui possèdent des grou-

pements fonctionnels acides ou basiques, vont être produites sous forme d'ions en phase gazeuse dans l'electrospray. En particulier, les peptides et les protéines forment facilement des entités positivement chargées par protonation à cause de la présence de sites fortement basiques. À l'inverse, les nucléotides se trouvent aisément négativement chargés lors de la déprotonation de leurs groupements acides.

Le chargement par cette première méthode de l'analyte est néanmoins beaucoup plus compliqué dans le cas d'espèces qui ne possèdent pas de groupes acides (pour la déprotonation) ou basiques (pour la protonation). Il est alors possible de former des adduits avec différents ions, ce qui peut conduire à la création d'entités négatives ou positives selon le type de solvant utilisé. Par exemple, dans le cas d'un fonctionnement de la source en mode négatif, il est possible de former des adduits chargés négativement à partir du chlore contenu dans un solvant tel que le chloroforme [198]. Des molécules neutres ou ne possédant que des sites très faiblement acides vont ainsi pouvoir produire un faisceau négatif stable. Pour un fonctionnement en mode positif, les expérimentateurs ont souvent recours à la formation d'adduits comportant des cations tels que des ions sodium ou ammonium par l'adjonction de sels² dans la solution [199]. Cependant, la concentration en sel doit rester faible afin d'éviter une pollution du spectre, qui rend difficile la détection des biomolécules. Remarquons qu'il est fréquent que de faibles concentrations de sodium soient présentes comme impuretés dans les solvants utilisés pour préparer la solution [200].

La seconde voie d'ionisation intervient au niveau du contact entre la solution et l'aiguille métallique portée à la haute tension par l'intermédiaire de réactions électrochimiques [153]. Lorsque l'aiguille est portée à un potentiel positif, il s'agit de réactions d'oxydation, alors que dans le mode de production d'espèces négatives, ce sont des réductions qui interviennent. Ainsi, grâce à ces réactions, des biomolécules neutres peuvent être converties en molécules chargées qui seront ensuite guidées dans la source electrospray. D'un autre côté, ce type de réactions peut également avoir un effet destructeur, puisqu'elles peuvent conduire à l'endommagement des biomolécules. Ces réactions électrochimiques induisent en effet des oxydations de l'analyte (changement des états d'oxydation des biomolécules), du contact métallique ou du solvant. Par exemple, en mode positif, l'oxydation du contact métallique de l'aiguille en acier va conduire à la production de cations Fe^{2+} dans la solution [201]. Leur création au niveau de la pointe n'est généralement pas un problème puisque ces cations sont le plus souvent solvatés et ne jouent donc pas de rôle dans la processus de chargement de l'electrospray. Ceci étant, du point de vue de l'optimisation de la source, le changement de l'aiguille pour une pointe formée d'un métal différent peut grandement influencer les réactions électrochimiques qui se produisent au niveau du contact avec la solution. Cet aspect est particulièrement intéressant dans le cadre d'études, qui porteraient sur l'interaction de biomolécules et d'ions métalliques (par exemple dans le cas des porphyrines) [202].

La dernière voie d'ionisation des biomolécules dans le processus d'electrospray provient

2. Un sel est un composé ionique composé de cations et d'anions et qui forme un produit neutre qui ne possède pas de charge (par exemple : NaCl).

de réactions en phase gazeuse. En effet, comme la formation du spray intervient à pression atmosphérique, des interactions en phase gazeuse se produisent, ce qui conduit à la formation d'espèces chargées [156, 203]. Ces interactions interviennent lorsque l'analyte a quitté la solution, c'est-à-dire à la fin du processus de formation des espèces chargées. Il s'agit essentiellement de réactions de transfert de protons en phase gazeuse, dans lesquelles des molécules qui ont été protonées en solution vont céder leurs protons aux analytes qui possèdent une plus grande basicité en phase gazeuse. Ainsi, des biomolécules neutres formées par évaporation des gouttelettes peuvent devenir chargées par ces réactions en phase gazeuse. Remarquons que cela se produit généralement lors de l'inversion de basicité, qui intervient entre la phase liquide et la phase gazeuse [156]. En effet, cette inversion s'explique par le fait que, pour une même molécule, la basicité en phase liquide et la basicité en phase gazeuse ne sont, *a priori*, pas corrélées et peuvent être assez différentes. Précisément, la basicité en phase gazeuse est définie par rapport à l'affinité protonique, alors que la mesure de la basicité en phase liquide s'exprime en terme de pK_a (grandeur définie à partir de la constante d'acidité). Dans le cadre de l'optimisation de la réponse d'une source electrospray, il est utile de mentionner les résultats de l'expérience menée par Amad et ses collaborateurs [204]. L'équipe a montré que les propriétés du solvant avaient une incidence très forte sur l'intensité de production des biomolécules chargées. Ils ont observé la formation d'agrégats de méthanol et d'eau pour différentes proportions du mélange méthanol/eau. Leurs résultats montrent que les molécules de solvant, qui possèdent la plus grande affinité protonique en phase gazeuse (ici les molécules de méthanol : 761 kJ/mol), vont capturer les protons des autres molécules de solvant (eau : 697 kJ/mol), éliminant toute production d'agrégat d'eau. Ceci est observé dès les plus petites concentrations en méthanol. Dans la situation où le solvant utilisé possède une affinité protonique en phase gazeuse plus grande que celle de la biomolécule, la réponse de l'analyte peut être complètement supprimée. Ainsi, il faut être particulièrement vigilant lors de l'utilisation du solvant. Pour obtenir les meilleures performances, on s'attachera toujours à utiliser un solvant possédant une affinité protonique en phase gazeuse plus petite que la biomolécule que l'on souhaite étudier avec la source electrospray.

Activité surfacique des biomolécules

La réponse d'une source electrospray est également conditionnée par la biomolécule elle-même. Ainsi, deux molécules différentes placées dans des solutions de composition identique n'ont pas la même efficacité de production. Zhou et Cook ont montré, en 2001 [196], que la réponse était significativement plus importante avec la phenylalanine (acide aminé) qu'avec la sérine (autre acide aminé) dans les mêmes conditions de production. Cette différence dans la réponse de la source electrospray provient de la structure même de l'analyte. Dans l'expérience précédente, la chaîne latérale de la phenylalanine est hydrophobe (apolaire), tandis que celle de la sérine est polaire. Le résultat obtenu est lié au fait que les ions apolaires vont préférer se placer à la surface des gouttelettes, c'est-à-dire à une interface avec l'air. Les molécules apolaires vont avoir tendance à être plus facilement dé-

solvatées et à avoir une meilleure réponse que les molécules polaires restées à l'intérieur de la gouttelette. De façon générale, les analytes qui ont une forte affinité pour la surface des gouttelettes possèdent une meilleure efficacité de production dans l'electrospray. Ce comportement peut s'expliquer par plusieurs raisons. D'une part, parce que les ions les moins solvatés se retrouveront plus facilement isolés en phase gazeuse lors de l'évaporation et vont donc contribuer de façon plus importante à la réponse de la source. D'autre part, parce que les ions polaires qui se retrouvent à l'intérieur de la gouttelettes vont être neutralisés par recombinaison avec des espèces de charge opposée, afin d'assurer la neutralité de l'intérieur de la gouttelettes (l'excès de charges est présent à la surface de la goutte). Les ions ainsi neutralisés vont principalement s'évaporer sous forme de sels et ne seront donc pas détectables par le spectromètre. Par conséquent, ce sont essentiellement les espèces présentes à la surface qui contribueront à la réponse de la source. Plus un analyte est présent à la surface et plus l'efficacité de production par electrospray sera grande. Ceci peut être vérifié expérimentalement en étudiant l'intensité de production d'espèces possédant une faible activité de surface. L'équipe de Bahr a ainsi montré que des oligosaccharides qui sont difficiles à obtenir avec une electrospray traditionnelle (à cause des raisons que nous avons évoquées), pouvaient néanmoins être produits en grande proportion avec une source nanospray [205, 206]. La différence de réponse entre les deux systèmes s'expliquant par le fait que les gouttelettes générées par la source nanospray sont 100 à 1000 fois plus petites que celles d'une electrospray traditionnelle. Comme le rapport surface/volume de la goutte est très grand dans les sources nanospray, la production des oligosaccharides est, ici, facilitée car il est possible de générer, plus directement, des ions en phase gazeuse.

L'importance de l'activité surfacique dans la réponse de la source electrospray doit donc être prise en compte lors du choix des molécules à étudier, pour les expériences ultérieures qui nécessiteront des faisceaux stables et intenses de biomolécules. Par exemple, dans l'étude des peptides, si le choix est possible, on peut choisir de privilégier les molécules qui possèdent des chaînes latérales apolaires (hydrophobes).

Par ailleurs, si la biomolécule à étudier est fortement apolaire, on peut envisager, du point de vue instrumental, d'utiliser des aiguilles de plus petits diamètres dans le but de former des gouttelettes plus petites et de faciliter ainsi la production des espèces en phase gazeuse. L'examen microscopique de la formation du cône de Taylor a montré que celui-ci prend forme sur l'extérieur de l'aiguille. C'est donc le diamètre extérieur de la pointe qui conditionne la taille des gouttes [153, 159]. La diminution du diamètre intérieur, quant à lui, permet d'utiliser des flux plus faibles et donc de consommer moins de solution. A l'heure actuelle, les aiguilles les plus fines ne peuvent être réalisées qu'à partir de capillaire en verre non conducteur. La difficulté de la miniaturisation des pointes, outre leur fragilité, réside donc essentiellement dans la polarisation de la solution à l'extrémité de l'aiguille. À l'avenir, et compte tenu des améliorations proposées dans cette partie, il est possible d'envisager la réalisation de dispositifs en verre métallisé comprenant plusieurs pointes de très petits diamètres et permettant la formation de multiples cônes de Taylor, afin d'accroître l'intensité du faisceau.

8.5.3 De l'importance du solvant

La question de l'affinité protonique en phase gazeuse évoquée ci-dessus a mis en avant l'importance du solvant dans la production de biomolécules. L'électrospray est utilisée avec des solutions qui contiennent une concentration importante d'espèces sous forme ionique. Leur présence est indispensable pour que la séparation des charges puisse avoir lieu au niveau de la pointe. La présence d'un porteur de charge dans la solution est donc indispensable pour la stabilité du processus d'électrospray. Il peut s'agir soit de biomolécules chargées, soit d'un électrolyte ajouté au solvant (par exemple : l'acide acétique) ou encore un produit chargé issu des réactions électrochimiques. Nous donnons dans la suite la composition des solutions et les solvants les plus efficaces pour la production d'espèces positives puis négatives.

Solvants pour la production de cations

Les solutions usuellement utilisées pour la production de cations sont des solutions protonées de méthanol/eau (parfois d'acétonitrile et d'eau). Un acide faible est ajouté à la solution (souvent de l'acide acétique), ce qui permet la protonation des biomolécules. La charge est donc portée à la fois par la biomolécule elle-même, mais aussi et surtout par les agrégats de solvants protonés formés par réaction avec l'acide. Ces derniers sont les porteurs de charges majoritaires du fait de la faible concentration de biomolécules généralement utilisée (de l'ordre de 10^{-6} mol/L). Les solvants acides sont, entre autres, particulièrement bien adaptés aux molécules telles que les peptides, à cause de la présence de groupement fonctionnel basique. L'étude d'espèces polaires peut être facilitée par la formation d'adduit, comme nous l'avons précédemment mentionné. Il suffit alors d'ajouter, à la solution méthanol/eau, un sel de façon à obtenir un porteur de charges stable. Suivant le sel utilisé, il pourra s'agir de cations sodium ou d'ammonium. Ainsi, la production de biomolécules chargées positivement est relativement simple, puisque le solvant à utiliser est à peu près universel.

Solvants pour la production d'anions

Les premiers travaux menés, à la fin des années 80, sur des espèces chargées négativement ont rapidement montré que les solutions de méthanol/eau à pH basique ne permettaient pas d'obtenir des faisceaux stables de biomolécules [138]. En effet, il est apparu que trop peu d'anions stables étaient générés par ces solutions, ce qui empêchait l'obtention d'un processus de séparation de charges efficace. Le mode de fonctionnement négatif de la source électrospray nécessite donc un solvant qui crée une quantité importante d'anions. C'est le cas des solvants halogénés, qui vont produire des ions négatifs, lors de leur réduction par réaction électrochimique, au niveau du contact électrique de la pointe. Un exemple de solvant approprié est le chloroforme, dont la réduction forme des ions de chlore. Les biomolécules chargées négativement sont alors produites, soit par arrachement d'un proton, soit par attachement d'un Cl^- . Récemment, l'utilisation d'une solution de 10% de 2,2,2-

trifluoroethanol et de 90% de méthanol a également permis l'obtention de spectre à très bas bruit de fond facilitant l'utilisation de très faible concentration de biomolécules [207]. D'une manière générale, l'utilisation des solvants fluorés conduit à la formation en grand nombre d'anions très sables. Ils permettent également de limiter la création de décharges, qui interviennent facilement, en mode négatif, entre la pointe et l'entrée du capillaire chauffant. Les solvants halogénés sont donc particulièrement recommandés pour l'étude des anions de biomolécules.

Conclusion

Ce travail de thèse a consisté en l'étude de la fragmentation de molécules d'intérêt biologique isolées et nano-solvatées induite par des collisions avec des ions multichargés de basse énergie et des collisions avec des particules neutres. Pour cela, nous avons eu recours à différents dispositifs expérimentaux afin de comprendre la dynamique de fragmentation et le transfert d'énergie qui résulte de ces types d'interaction.

Dans une première partie, afin de se concentrer uniquement sur les propriétés intrinsèques de quelques molécules d'intérêt biologique, nous nous sommes intéressés aux systèmes biomoléculaires isolés. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la stabilité remarquable des molécules de porphyrine soumises à une excitation intense du cortège électronique. Nous avons également constaté que les ions multichargés permettaient l'ouverture de nouvelles voies de fragmentation (multichargement, émission possible de Cl^-) non observées dans l'ionisation par des électrons à 70 eV, par exemple.

La nécessité de prendre en compte un environnement biologique pour pouvoir envisager à l'avenir un lien plus fort avec la radiochimie, nous a conduits à réaliser des expériences sur des systèmes modèles susceptibles de produire un premier effet de solvation. Les résultats obtenus sont particulièrement probants : dans le cas des agrégats de nucléobases, on observe l'apparition de nouvelles voies de fragmentation qui ne sont pas présentes pour la molécule isolée ; dans le cas des dipeptides complexés et nano-solvatés, un changement flagrant des rapports de branchement entre les différents canaux connus est révélé.

Les conclusions conjointes de ces deux parties rendent compte de l'intérêt que peuvent avoir des études futures sur la dynamique de fragmentation d'espèces solvatées induite par les ions multichargés de basse énergie. Dans ce contexte, un dispositif expérimental dédié à la production d'espèces biomoléculaires environnées a été réalisé pendant cette thèse. Il est composé d'une source electrospray et d'un analyseur en masse quadripolaire, permettant la réalisation, en phase gazeuse, de biomolécules hydratées. En particulier, nous avons montré la faisabilité de faisceaux de système hydraté sur les molécules de thymine et d'adénine. Parallèlement à cela, nous avons également travaillé sur l'optimisation de la production d'agrégats d'eau protonnés. Sur la base des résultats des premiers tests de fonctionnement, nous avons proposé un ensemble d'améliorations susceptibles d'accroître le potentiel du dispositif expérimental, dans la perspective d'expériences d'interaction entre faisceaux de biomolécules solvatées et ions multichargés de basse énergie. De ce point de vue, la source electrospray représente la première étape du projet ANR PIBALE, qui a été accepté en 2009, et qui devrait permettre la réalisation de ce type d'études.

V

Annexes

Bibliographie

- [1] E. SCHRÖDINGER : *What is Life ? : The Physical Aspect of the Living Cell; With, Mind and Matter; & Autobiographical Sketches*. Cambridge University Press, 1992.
- [2] JD WATSON et FHC CRICK : Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356):737–738, 1953.
- [3] DE CLEMMER et MF JARROLD : Ion mobility measurements and their applications to clusters and biomolecules. *Journal Of Mass Spectrometry*, 32(6):577–592, 1997.
- [4] TD VEENSTRA : Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions. *Biophysical Chemistry*, 79(2):63–79, 1999.
- [5] DP LITTLE, JP SPEIR, MW SENKO, PB OCONNOR et FW MCLAFFERTY : Infrared multiphoton dissociation of large multiply-charged ions for biomolecule sequencing. *Analytical Chemistry*, 66(18):2809–2815, 1994.
- [6] B. LIU, S. Brondsted NIELSEN, P. HVELPLUND, H. ZETTERGREN, H. CEDERQUIST, B. MANIL et B. A. HUBER : Collision-induced dissociation of hydrated adenosine monophosphate nucleotide ions : Protection of the ion in water nanoclusters. *Physical Review Letters*, 97, 133401(13), 2006.
- [7] P FORTERRE : The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Research*, 117(1):5–16, 2006.
- [8] G SIUZDAK, B BOTHNER, M YEAGER, C BRUGIDOU, CM FAUQUET, K HOEY et CM CHANG : Mass spectrometry and viral analysis. *Chemistry & Biology*, 3(1):45–48, 1996.
- [9] Stephan DENIFL, Fabio ZAPPA, Ingo MAHR, Julien LECOINTRE, Michael PROBST, Tilmann D. MARK et Paul SCHEIER : Mass spectrometric investigation of anions formed upon free electron attachment to nucleobase molecules and clusters embedded in superfluid helium droplets. *Physical Review Letters*, 97(4), 2006.
- [10] LC SNOEK, T VAN MOURIK et JP SIMONS : Neurotransmitters in the gas phase : A computational and spectroscopic study of noradrenaline. *Molecular Physics*, 101(9): 1239–1248, 2003.
- [11] A WATTENBERG, F SOBOTT, HD BARTH et B BRUTSCHY : Laser desorption mass spectrometry on liquid beams. *European Mass Spectrometry*, 5(2):71–76, 1999.
- [12] F MAFUNE, J KOHNO, T NAGATA et T KONDOW : Mechanism of ion ejection from a liquid beam following laser photoionization. *Chemical Physics Letters*, 218(1-2):7–12, 1994.
- [13] W KLEINEKOFORT, A PFENNINGER, T PLOMER, C GRIESINGER et B BRUTSCHY : Observation of noncovalent complexes using laser-induced liquid beam ionization desorption. *International Journal Of Mass Spectrometry And Ion Processes*, 156(3): 195–202, 1996.
- [14] N MORGNER, HD BARTH et B BRUTSCHY : A new way to detect noncovalently bonded complexes of biomolecules from liquid micro-droplets by laser mass spectrometry. *Australian Journal Of Chemistry*, 59(2):109–114, 2006.
- [15] J KOHNO, N TOYAMA et T KONDOW : Ion formation to the gas phase by laser ablation on a droplet beam. *Chemical Physics Letters*, 420(1-3):146–150, 2006.

- [16] M KARAS et R KRUGER : Ion formation in maldi : The cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews*, 103(2):427–439, 2003.
- [17] K TANAKA : The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition*, 42(33):3860–3870, 2003.
- [18] L ADOUI, C CARABY, A CASSIMI, D LELIEVRE, JP GRANDIN et A DUBOIS : Fast ion-induced co molecule fragmentation in the strong interaction regime. *Journal Of Physics B-Atomic Molecular And Optical Physics*, 32(3):631–647, 1999.
- [19] M TARISIEN, L ADOUI, F FREMONT et A CASSIMI : Rims for electron capture and molecular fragmentation study : He^{2+} (11 kev/u) and o^{7+} (4 kev/u) + co collisions. *Physica Scripta*, T80B:182–184, 1999.
- [20] W PAUL : Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Reviews Of Modern Physics*, 62(3):531–540, 1990.
- [21] C. von SONNTAG : *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis London, 1987.
- [22] C. von SONNTAG : *Free-radical-induced DNA damage and its repair : a chemical perspective*. Springer, 2006.
- [23] B FAYARD, A TOUATI, F ABEL, MAH du PENHOAT, I DESPINEY-BAILLY, F GOBERT, M RICOUL, A L’HOIR, MF POLITIS, MA HILL, DL STEVENS, L SABATIER, E SAGE, DT GOODHEAD et A CHETIOUI : Cell inactivation and double-strand breaks : The role of core ionizations, as probed by ultrasoft x rays. *Radiation Research*, 157(2):128–140, 2002.
- [24] MA HUELS, I HAHNDORF, E ILLENBERGER et L SANCHE : Resonant dissociation of dna bases by subionization electrons. *Journal Of Chemical Physics*, 108(4):1309–1312, 1998.
- [25] M GROMOVA, E BALANZAT, B GERVAIS, R NARDIN et J CADET : The direct effect of heavy ions and electrons on thymidine in the solid state. *International Journal Of Radiation Biology*, 74(1):81–97, 1998.
- [26] KM PRISE, CHL PULLAR et BD MICHAEL : A study of endonuclease iii-sensitive sites in irradiated dna : Detection of alpha-particle-induced oxidative damage. *Carcinogenesis*, 20(5):905–909, 1999.
- [27] MAH du PENHOAT, B FAYARD, F ABEL, A TOUATI, F GOBERT, I DESPINEY-BAILLY, M RICOUL, L SABATIER, DL STEVENS, MA HILL, DT GOODHEAD et A CHETIOUI : Lethal effect of carbon k-shell photoionizations in chinese hamster v79 cell nuclei : Experimental method and theoretical analysis. *Radiation Research*, 151(6):649–658, 1999.
- [28] FN GOBERT, A LAMOUREUX, MAH DU PENHOAT, M RICOUL, A BOISSIERE, A TOUATI, F ABEL, MF POLITIS, B FAYARD, JM GUIGNER, L MARTINS, I TESTARD, L SABATIER et A CHETIOUI : Chromosome aberrations and cell inactivation induced in mammalian cells by ultrasoft x-rays : Correlation with the core ionizations in dna. *International Journal Of Radiation Biology*, 80(2):135–145, 2004.
- [29] B BOUDAFFA, P CLOUTIER, D HUNTING, MA HUELS et L SANCHE : Resonant formation of dna strand breaks by low-energy (3 to 20 ev) electrons. *Science*, 287(5458):1658–1660, 2000.
- [30] J de VRIES, R HOEKSTRA, R MORGENSTERN et T SCHLATHOLTER : Multiple ionization and fragmentation of the dna base thymine by interaction with cq^{+} ions. *European Physical Journal D*, 24(1-3):161–164, 2003.

- [31] R BREDY, J BERNARD, L CHEN, B WEI, A SALMOUN, T BOUCHAMA, MC BUCHET-POULIZAC et S MARTIN : Fragmentation of adenine induced by collision with slow f_2^+ ions. *Nuclear Instruments & Methods In Physics Research Section B-Beam Interactions With Materials And Atoms*, 235:392–396, 2005.
- [32] Patrick MORETTO-CAPELLE et Arnaud LE PADELLEC : Electron spectroscopy in proton collisions with dry gas-phase uracil base. *Physical Review A*, 74(6), 2006.
- [33] J.B. FORESMAN, Æ. FRISCH et I. GAUSSIAN : *Exploring Chemistry With Electronic Structure Methods*. Gaussian Pittsburgh, Pa, 1996.
- [34] M.J. FRISCH, GW TRUCKS, HB SCHLEGEL, GE SCUSERIA, MA ROBB, JR CHEESEMAN, JA MONTGOMERY JR, T. VREVEN, KN KUDIN, JC BURANT *et al.* : Gaussian 03, revision c. 02, gaussian. Inc., Wallingford, CT, 2004.
- [35] MJS DEWAR, EG ZOEBISCH, EF HEALY et JJP STEWART : The development and use of quantum-mechanical molecular models .76.am1 - a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal Of The American Chemical Society*, 107(13): 3902–3909, 1985.
- [36] JJP STEWART : Optimization of parameters for semiempirical methods .1. method. *Journal Of Computational Chemistry*, 10(2):209–220, 1989.
- [37] JJP STEWART : Optimization of parameters for semiempirical methods .2. applications. *Journal Of Computational Chemistry*, 10(2):221–264, 1989.
- [38] M.J.S. DEWAR et W. THIEL : Ground states of molecules. 38. the mndo method. approximations and parameters. *Journal Of The American Chemical Society*, 99(15): 4899–4907, 1977.
- [39] A. SZABO et N.S. OSTLUND : *Modern quantum chemistry*. McGraw-Hill New York, 1989.
- [40] C. MØLLER et MS PLESSET : Note on an approximation treatment for many-electron systems. *Physical Review*, 46(7):618–622, 1934.
- [41] P HOHENBERG et W KOHN : Inhomogeneous electron gas. *Physical Review B*, 136(3B):864–871, 1964.
- [42] W KOHN et LJ SHAM : Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140(4A):1133–1138, 1965.
- [43] A ROSA, G RICCIARDI, EJ BAERENDS, A ROMEO et LM SCOLARO : Effects of porphyrin core saddling, meso-phenyl twisting and counterions on the optical properties of meso-tetraphenylporphyrin diacids : The [h4tpp](x)(2) (x = f, cl, b, i) series as a case study. *Journal Of Physical Chemistry A*, 107(51):11468–11482, 2003.
- [44] DM TOMAZELA, FC GOZZO, I MAYER, RM ENGELMANN, K ARAKI, HE TOMA et MN EBERLIN : Electrospray mass and tandem mass spectrometry of homologous and isomeric singly, doubly, triply and quadruply charged cationic ruthenated meso-(phenyl)(m)-(meta- and para-pyridyl)(n) (m+n=4) macrocyclic porphyrin complexes. *Journal Of Mass Spectrometry*, 39(10):1161–1167, 2004.
- [45] Cristhian BERRIOS, Gloria I. CARDENAS-JIRON, Jose F. MARCO, Claudio GUTIERREZ et Maria Soledad URETA-ZANARTU : Theoretical and spectroscopic study of nickel(ii) porphyrin derivatives. *Journal Of Physical Chemistry A*, 111(14):2706–2714, 2007.
- [46] CB NIELSEN, JS FORSTER, PR OGILBY et SB NIELSEN : Delayed dissociation of photoexcited porphyrin cations in a storage ring : Determination of triplet quantum yields. *Journal Of Physical Chemistry A*, 109(17):3875–3879, 2005.

- [47] AR BATTERSBY : How nature builds the pigments of life. *Pure And Applied Chemistry*, 65(6):1113–1122, 1993.
- [48] AR BATTERSBY : Biosynthesis of vitamin-b12. *Accounts Of Chemical Research*, 26(1):15–21, 1993.
- [49] A NEUBERGER : Discussion on biosynthesis of porphyrins, chlorophyll and vitamin-b12 - introductory remarks. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences*, 273(924):77–78, 1976.
- [50] M. GOTO, Y. YASUDA, S. JINNO, T. TAKAO, K. HANADA, H. TANUMA, T. AZUMA, K.-I. SUGIURA, H. SHIROMARU et Y. ACHIBA : Electron detachment of super-excited porphyrin anions in an electrostatic ion storage ring. *European Physical Journal D*, 43(1-3):65–68, 2007.
- [51] VSY LIN, SG DIMAGNO et MJ THERIEN : Highly conjugated, acetylenyl bridged porphyrins - new models for light-harvesting antenna systems. *Science*, 264(5162):1105–1111, 1994.
- [52] FM RAYMO et M TOMASULO : Electron and energy transfer modulation with photochromic switches. *Chemical Society Reviews*, 34(4):327–336, 2005.
- [53] Lauceri ROSARIA, Alessandro D'URSO, Angela MAMMANA et Rober PURRELLO : Chiral memory : Induction, amplification, and switching in porphyrin assemblies. *Chirality*, 20(3-4):411–419, 2008.
- [54] QL LI, G MATHUR, S GOWDA, S SURTHI, Q ZHAO, LH YU, JS LINDSEY, DF BOCIAN et V MISRA : Multibit memory using self-assembly of mixed ferrocene/porphyrin monolayers on silicon. *Advanced Materials*, 16(2):133–137, 2004.
- [55] R LAUCERI et R PURRELLO : Transfer, memory and amplification of chirality in porphyrin aggregates. *Supramolecular Chemistry*, 17(1-2):61–66, 2005.
- [56] S. FEIL, M. WINKLER, P. SULZER, S. PTASINSKA, S. DENIFL, F. ZAPPA, B. KRAEUTLER, T. D. MAERK et P. SCHEIER : Single, double and triple ionization of tetraphenyl iron(iii) porphyrin chloride. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 255:232–238, 2006.
- [57] L MAUNOURY, R LEROY, T BEEN, G GAUBERT, L GUILLAUME, D LECLERC, A LEPOUTRE, V MOUTON, JY PACQUET, JM RAMILLON, R VICQUELIN et GANIL ION PRODUCT GRP : Limbe : A new facility for low energy beams. *Review Of Scientific Instruments*, 73(2, Part 2):561–563, 2002.
- [58] WC WILEY et IH MCLAREN : Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. *Review Of Scientific Instruments*, 26(12):1150–1157, 1955.
- [59] NR DALY : Scintillation type mass spectrometer ion detector. *Review Of Scientific Instruments*, 31(3):264–267, 1960.
- [60] B WALCH, CL COCKE, R VOELPEL et E SALZBORN : Electron-capture from c-60 by slow multiply-charged ions. *Physical Review Letters*, 72(10):1439–1442, 1994.
- [61] T SCHLATHOLTER, O HADJAR, R HOEKSTRA et R MORGENSTERN : Electronic stopping in ion-fullerene collisions. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, 72(3):281–287, 2001.
- [62] F. CHANDEZON : *Etude expérimentale de la stabilité d'agrégats de sodium multi-charges produits par collision d'agrégats neutres avec des ions*. Thèse de doctorat, Université de Grenoble 1, Saint-Martin-d'Hères, FRANCE, 1994.
- [63] S MARTIN, L CHEN, A DENIS, R BREDY, J BERNARD et J DESESQUELLES : Excitation and fragmentation of c-60(r+) (r=3-9) in xe30+-c-60 collisions. *Physical Review A*, 62, 022707(2), 2000.

- [64] A BRENAC, E CHANDEZON, H LEBIUS, A PESNELLE, S TOMITA et BA HUBER : Multifragmentation of highly charged c-60 ions : Charge states and fragment energies. *Physica Scripta*, T80B:195–196, 1999.
- [65] P HVELPLUND, B LIU, SB NIELSEN et S TOMITA : Electron capture induced dissociation of peptide dications. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 225(1):83–87, 2003.
- [66] Tapas CHAKRABORTY, Anne I. S. HOLM, Preben HVELPLUND, Steen Brondsted NIELSEN, Jean-Christophe POULLY, Esben S. WORM et Evan R. WILLIAMS : On the survival of peptide cations after electron capture : Role of internal hydrogen bonding and microsolvation. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 17(12):1675–1680, 2006.
- [67] Anne I. S. HOLM, Preben HVELPLUND, Umesh KADHANE, Mikkel Koefoed LARSEN, Bo LIU, Steen Brondsted NIELSEN, Subhasis PANJA, Jan Mondrup PEDERSEN, Troels SKRYDSTRUP, Kristian STOCHKEL, Evan R. WILLIAMS et Esben S. WORM : On the mechanism of electron-capture-induced dissociation of peptide dications from n-15-labeling and crown-ether complexation. *Journal Of Physical Chemistry A*, 111(39):9641–9643, 2007.
- [68] OV BOLTALINA, P HVELPLUND, TJD JORGENSEN, MC LARSEN, MO LARSSON et DA SHAROITCHENKO : Electron capture by fluorinated fullerene anions in collisions with xe atoms. *Physical Review A*, 62(2), 2000.
- [69] MO LARSSON, P HVELPLUND, MC LARSEN, H SHEN, H CEDERQUIST et HT SCHMIDT : Electron capture and energy loss in similar to 100 kev collisions of atomic and molecular ions on c-60. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 177(1):51–62, 1998.
- [70] OP CHARKIN, NM KLIMENKO, PT NGUYEN, DO CHARKIN, AM MEBEL, SH LIN, YS WANG, SC WEI et HC CHANG : Fragmentation of heme and hemin(+) with sequential loss of carboxymethyl groups : A dft and mass-spectrometry study. *Chemical Physics Letters*, 415(4-6):362–369, 2005.
- [71] O. P. CHARKIN, N. M. KLIMENKO, D. O. CHARKIN, H.-C. CHANG et S.-H. LIN : Theoretical dft study of fragmentation and association of heme and hemin. *Journal Of Physical Chemistry A*, 111(38):9207–9217, 2007.
- [72] P HVELPLUND, SB NIELSEN, M SORENSSEN, JU ANDERSEN et TJD JORGENSEN : Electron loss from multiply protonated lysozyme ions in high energy collisions with molecular oxygen. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 12(8): 889–893, 2001.
- [73] B LIU, P HVELPLUND, SB NIELSEN et S TOMITA : Hydrogen loss from nucleobase nitrogens upon electron attachment to isolated dna and rna nucleotide anions. *Journal Of Chemical Physics*, 121(9):4175–4179, 2004.
- [74] Minli TAO, Xueqin ZHOU, Ma JING, Dongzhi LIU et Jun XING : Fluorescence and electrochemical properties of naphthylporphyrins and porphyrin-anthraquinone dyads. *Dyes And Pigments*, 75(2):408–412, 2007.
- [75] RP CHENG, SH GELLMAN et WF DEGRADO : Beta-peptides : From structure to function. *Chemical Reviews*, 101(10):3219–3232, 2001.
- [76] BA MAMYRIN, VI KARATAEV, DV SHMIKK et VA ZAGULIN : Mass-reflectron a new nonmagnetic time-of-flight high resolution mass spectrometer. *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki*, 64(1):82–89, 1973.

- [77] O HADJAR, R HOEKSTRA, R MORGENSTERN et T SCHLATHOLTER : Projectile atomic-number effect on ion-induced fragmentation and ionization of fullerenes. *Physical Review A*, 63(3), 2001.
- [78] D WINKOUN et G DUJARDIN : Fragmentation of doubly charged ammonia cations $\text{nh-3}(++)$ studied by the photoion-photoion coincidence (pipico) method. *Zeitschrift Fur Physik D-Atoms Molecules And Clusters*, 4(1):57–64, 1986.
- [79] S SIMON, A GIL, M SODUPE et J BERTRAN : Structure and fragmentation of glycine, alanine, serine and cysteine radical cations. a theoretical study. *Journal Of Molecular Structure-Theochem*, 727(1-3):191–197, 2005.
- [80] G JUNK et H SVEC : Mass spectra of alpha-amino acids. *Journal Of The American Chemical Society*, 85(7):839–843, 1963.
- [81] HW JOCHIMS, M SCHWELL, JL CHOTIN, M CLEMINO, F DULIEU, H BAUMGARTEL et S LEACH : Photoion mass spectrometry of five amino acids in the 6-22 ev photon energy range. *Chemical Physics*, 298(1-3):279–297, MAR 8 2004.
- [82] F ALVARADO, S BARI, R HOEKSTRA et T SCHLATHOLTER : Quantification of ion-induced molecular fragmentation of isolated 2-deoxy-d-ribose molecules. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 8(16):1922–1928, 2006.
- [83] S BLANCO, A LESARRI, JC LOPEZ et JL ALONSO : The gas-phase structure of alanine. *Journal Of The American Chemical Society*, 126(37):11675–11683, 2004.
- [84] ME SANZ, A LESARRI, MI PENA, V VAQUERO, V CORTIJO, JC LOPEZ et JL ALONSO : The shape of beta-alanine. *Journal Of The American Chemical Society*, 128(11):3812–3817, 2006.
- [85] Sankar DE, Jyoti RAJPUT, A. ROY, P. N. GHOSH et C. P. SAFVAN : Formation of $\text{h-3}(+)$ due to intramolecular bond rearrangement in doubly charged methanol. *Physical Review Letters*, 97(21), 2006.
- [86] JHD ELAND, FS WORT et RN ROYDS : A photoelectron ion ion triple coincidence technique for the study of double photoionization and its consequences. *Journal Of Electron Spectroscopy And Related Phenomena*, 41(3-4):297–309, 1986.
- [87] I MICHALARIAS, XL GAO, RC FORD et JC LI : Recent progress on our understanding of water around biomolecules. *Journal Of Molecular Liquids*, 117(1-3, Sp. Iss. SI):107–116, 2005.
- [88] SK PAL et AH ZEWAİL : Dynamics of water in biological recognition. *Chemical Reviews*, 104(4):2099–2123, 2004.
- [89] RP SEAR : The cytoplasm of living cells : A functional mixture of thousands of components. *Journal Of Physics-Condensed Matter*, 17(45, Sp. Iss. SI):3587–3595, 2005.
- [90] MF JARROLD : Unfolding, refolding, and hydration of proteins in the gas phase. *Accounts Of Chemical Research*, 32(4):360–367, 1999.
- [91] B JAYARAM et T JAIN : The role of water in protein-dna recognition. *Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure*, 33:343–361, 2004.
- [92] JE LADBURY : Just add water ! the effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chemistry & Biology*, 3(12):973–980, 1996.
- [93] Y LEVY et JN ONUCHIC : Water mediation in protein folding and molecular recognition. *Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure*, 35:389–415, 2006.

- [94] KA DILL, TM TRUSKETT, V VLACHY et B HRIBAR-LEE : Modeling water, the hydrophobic effect, and ion solvation. *Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure*, 34:173–199, 2005.
- [95] C BRECHIGNAC, P CAHUZAC, F CARLIER, M DEFRUTOS, A MASSON et JP ROUX : Generation of rare-earth-metal clusters by means of the gas-aggregation technique. *Zeitschrift Fur Physik D-Atoms Molecules And Clusters*, 19(1-4):195–197, 1991.
- [96] NJ KIM, H KANG, G JEONG, YS KIM, KT LEE et SK KIM : Even-odd alternation in mass spectrum of thymine and uracil clusters : Evidence of intracuster photodimerization. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 98(9):4841–4843, 2001.
- [97] HW JOCHIMS, M SCHWELL, H BAUMGARTEL et S LEACH : Photoion mass spectrometry of adenine, thymine and uracil in the 6-22 ev photon energy range. *Chemical Physics*, 314(1-3):263–282, JUL 18 2005.
- [98] JM RICE, GO DUDEK et M BARBER : Mass spectra of nucleic acid derivatives .1. pyrimidines. *Journal Of The American Chemical Society*, 87(20):4569–4576, 1965.
- [99] ZW DENG, M IMHOFF et MA HUELS : Fragmentation dynamics of condensed phase thymine by low-energy (10-200 ev) heavy-ion impact. *Journal Of Chemical Physics*, 123(14), 2005.
- [100] JM RICE et GO DUDEK : Mass spectra of nucleic acid derivatives .2. guanine adenine and related compounds. *Journal Of The American Chemical Society*, 89(11):2719–2725, 1967.
- [101] P HOBZA et J SPONER : Structure, energetics, and dynamics of the nucleic acid base pairs : Nonempirical ab initio calculations. *Chemical Reviews*, 99(11):3247–3276, 1999.
- [102] REA KELLY et LN KANTOROVICH : Homopairing possibilities of the dna base thymine and the rna base uracil : An ab initio density functional theory study. *Journal Of Physical Chemistry B*, 110(5):2249–2255, 2006.
- [103] REA KELLY, YJ LEE et LN KANTOROVICH : Homopairing possibilities of the dna base adenine. *Journal Of Physical Chemistry B*, 109(24):11933–11939, 2005.
- [104] SK KIM, W LEE et DR HERSCHBACH : Cluster beam chemistry : Hydration of nucleic acid bases ; ionization potentials of hydrated adenine and thymine. *Journal Of Physical Chemistry*, 100(19):7933–7937, 1996.
- [105] J.P. SCHERMANN : *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier Science, 2007.
- [106] ZW DENG, I BALD, E ILLENBERGER et MA HUELS : Beyond the bragg peak : Hyperthermal heavy ion damage to dna components. *Physical Review Letters*, 95(15), 2005.
- [107] I DAABKOWSKA, P JURECKA et P HOBZA : On geometries of stacked and h-bonded nucleic acid base pairs determined at various dft, mp2, and ccSD(t) levels up to the ccSD(t)/complete basis set limit level. *Journal Of Chemical Physics*, 122(20), 2005.
- [108] M KABELAC, C PLUTZER, K KLEINERMANN et P HOBZA : Isomer selective ir experiments and correlated ab initio quantum chemical calculations support planar h-bonded structure of the 7-methyl adenine center dot center dot center dot adenine and stacked structure of the 9-methyl adenine center dot center dot center dot adenine base pairs. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(10):2781–2785, 2004.

- [109] C PLUTZER, I HUNIG et K KLEINERMANN : Pairing of the nucleobase adenine studied by ir-uv double-resonance spectroscopy and ab initio calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(6):1158–1163, 2003.
- [110] M DEY, F MORITZ, J GROTEMEYER et EW SCHAG : Base pair formation of free nucleobases and mononucleosides in the gas-phase. *Journal Of The American Chemical Society*, 116(20):9211–9215, 1994.
- [111] J SPONER, J LESZCZYNSKI et P HOBZA : Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of dna and rna bases. *Biopolymers*, 61(1):3–31, 2001.
- [112] Ross E. A. KELLY et Lev N. KANTOROVICH : Planar heteropairing possibilities of the dna and rna bases : An ab initio density functional theory study. *Journal Of Physical Chemistry C*, 111(10):3883–3892, 2007.
- [113] RA ZUBAREV, NL KELLEHER et FW McLAFFERTY : Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. a nonergodic process. *Journal Of The American Chemical Society*, 120(13):3265–3266, 1998.
- [114] Y GE, BG LAWHORN, M ELNAGGAR, E STRAUSS, JH PARK, TP BEGLEY et FW McLAFFERTY : Top down characterization of larger proteins (45 kda) by electron capture dissociation mass spectrometry. *Journal Of The American Chemical Society*, 124(4):672–678, 2002.
- [115] SK SZE, Y GE, H OH et FW McLAFFERTY : Top-down mass spectrometry of a 29-kda protein for characterization of any posttranslational modification to within one residue. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 99(4):1774–1779, 2002.
- [116] Julia CHAMOT-ROOKE, Christian MALOSSE, Gilles FRISON et Frantisek TURECEK : Electron capture in charge-tagged peptides. evidence for the role of excited electronic states. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 18(12):2146–2161, 2007.
- [117] Steve M. M. SWEET et Helen J. COOPER : Electron capture dissociation in the analysis of protein phosphorylation. *Expert Review Of Proteomics*, 4(2):149–159, 2007.
- [118] Yury O. TSYBIN, Kim F. HASELMANN, Mark R. EMMETT, Christopher L. HENDRICKSON et Alan G. MARSHALL : Charge location directs electron capture dissociation of peptide dications. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 17(12):1704–1711, 2006.
- [119] RA ZUBAREV : Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(1):57–77, 2003.
- [120] NC POLFER, KF HASELMANN, PRR LANGRIDGE-SMITH et PE BARRAN : Structural investigation of naturally occurring peptides by electron capture dissociation and amber force field modelling. *Molecular Physics*, 103(11-12):1481–1489, 2005.
- [121] F TURECEK et EA SYRSTAD : Mechanism and energetics of intramolecular hydrogen transfer in amide and peptide radicals and cation-radicals. *Journal Of The American Chemical Society*, 125(11):3353–3369, 2003.
- [122] RR JULIAN et JL BEAUCHAMP : Site specific sequestering and stabilization of charge in peptides by supramolecular adduct formation with 18-crown-6 ether by way of electrospray ionization. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 210(1-3, Sp. Iss. SI):613–623, 2001.
- [123] I ANUSIEWICZ, J BERDYS-KOCHANSKA, P SKURSKI et J SIMONS : Simulating electron transfer attachment to a positively charged model peptide. *Journal Of Physical Chemistry A*, 110(4):1261–1266, 2006.

- [124] C WESDEMIOTIS et FW MCLAFFERTY : Neutralization reionization mass-spectrometry (nrms). *Chemical Reviews*, 87(3):485–500, 1987.
- [125] FW MCLAFFERTY : Studies of unusual simple molecules by neutralization-reionization mass spectrometry. *Science*, 247(4945):925–929, 1990.
- [126] P ROEPSTORFF et J FOHLMAN : Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 11(11):601, 1984.
- [127] Preben HVELPLUND, Bo LIU, Steen BRONSTED NIELSEN, Subliasis PANJA, Jean-Christophe POULLY et Kristian STOCHKE : Electron capture induced dissociation of peptide ions : Identification of neutral fragments from secondary collisions with cesium vapor. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 263(1):66–70, 2007.
- [128] James S. PRELL, Jeremy T. O'BRIEN, Anne I. S. HOLM, Ryan D. LEIB, William A. DONALD et Evan R. WILLIAMS : Electron capture by a hydrated gaseous peptide : Effects of water on fragmentation and molecular survival. *Journal Of The American Chemical Society*, 130(38):12680–12689, 2008.
- [129] M KOHTANI, GA BREUX et MF JARROLD : Water molecule adsorption on protonated dipeptides. *Journal Of The American Chemical Society*, 126(4):1206–1213, 2004.
- [130] YME FUNG, HC LIU et TWD CHAN : Electron capture dissociation of peptides metalated with alkaline-earth metal ions. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 17(6):757–771, 2006.
- [131] Haichuan LIU, Hyun Ju YOO et Kristina HAKANSSON : Characterization of phosphate-containing metabolites by calcium adduction and electron capture dissociation. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 19(6):799–808, JUN 2008.
- [132] M DOLE, LL MACK et RL HINES : Molecular beams of macroions. *Journal Of Chemical Physics*, 49(5):2240–2249, 1968.
- [133] JB FENN, M MANN, CK MENG, SF WONG et CM WHITEHOUSE : Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71, 1989.
- [134] JB FENN, M MANN, CK MENG, SF WONG et CM WHITEHOUSE : Electrospray ionization - principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 9(1):37–70, 1990.
- [135] M YAMASHITA et JB FENN : Electrospray ion-source - another variation on the free-jet theme. *Journal Of Physical Chemistry*, 88(20):4451–4459, 1984.
- [136] CM WHITEHOUSE, RN DREYER, M YAMASHITA et JB FENN : Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry*, 57(3):675–679, 1985.
- [137] M MANN, CK MENG et JB FENN : Interpreting mass-spectra of multiply charged ions. *Analytical Chemistry*, 61(15):1702–1708, 1989.
- [138] M YAMASHITA et JB FENN : Negative-ion production with the electrospray ion-source. *Journal Of Physical Chemistry*, 88(20):4671–4675, 1984.
- [139] B BOTHNER et G SIUZDAK : Electrospray ionization of a whole virus : Analyzing mass, structure, and viability. *Chembiochem*, 5(3):258–260, 2004.
- [140] SD FUERSTENAU, WH BENNER, JJ THOMAS, C BRUGIDOU, B BOTHNER et G SIUZDAK : Mass spectrometry of an intact virus. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(3):542–544, 2001.

- [141] CJ HOGAN, EM KETTLESON, B RAMASWAMI, DR CHEN et P BISWAS : Charge reduced electrospray size spectrometry of mega- and gigadalton complexes : Whole viruses and virus fragments. *Analytical Chemistry*, 78(3):844–852, 2006.
- [142] JB FENN : Electrospray wings for molecular elephants (nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition*, 42(33):3871–3894, 2003.
- [143] G TAYLOR : Disintegration of water drops in electric field. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Mathematical And Physical Sciences*, 280(138):383–397, 1964.
- [144] L. RAYLEIGH : On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Phil. Mag*, 14:184–186, 1882.
- [145] RJ PFEIFER et CD HENDRICK : Parametric studies of electrohydrodynamic spraying. *Aiaa Journal*, 6(3):496–502, 1968.
- [146] RB COLE : Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal Of Mass Spectrometry*, 35(7):763–772, 2000.
- [147] A GOMEZ et KQ TANG : Charge and fission of droplets in electrostatic sprays. *Physics Of Fluids*, 6(1):404–414, 1994.
- [148] DC TAFLIN, TL WARD et EJ DAVIS : Electrified droplet fission and the rayleigh limit. *Langmuir*, 5(2):376–384, 1989.
- [149] D DUFT, H LEBIUS, BA HUBER, C GUET et T LEISNER : Shape oscillations and stability of charged microdroplets. *Physical Review Letters*, 89(8), 2002.
- [150] D DUFT, T ACHTZEHN, R MULLER, BA HUBER et T LEISNER : Coulomb fission - rayleigh jets from levitated microdroplets. *Nature*, 421(6919):128, 2003.
- [151] KQ TANG et RD SMITH : Theoretical prediction of charged droplet evaporation and fission in electrospray ionization. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 187(Sp. Iss. SI):97–105, 1999.
- [152] JV IRIBARNE et BA THOMSON : Evaporation of small ions from charged droplets. *Journal Of Chemical Physics*, 64(6):2287–2294, 1976.
- [153] TC ROHNER, N LION et HH GIRAULT : Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionisation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6(12):3056–3068, 2004.
- [154] JB FENN : Ion formation from charged droplets - roles of geometry, energy and time. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 4(7):524–535, 1993.
- [155] J. Fernandez de la MORA : Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via dole’s charged residue mechanism. *Analytica Chimica Acta*, 406(1):93–104, 2000.
- [156] P. KEBARLE et M. PESCHKE : On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta*, 406(1):11–35, 2000.
- [157] G. WANG et R.B. COLE : Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide cluster ions in esi. *Analytica Chimica Acta*, 406(1):53–65, 2000.
- [158] A.P. SNYDER, American Chemical SOCIETY, Division of ANALYTICAL CHEMISTRY et MEETING : *Biochemical and biotechnological applications of electrospray ionization mass spectrometry*. American Chemical Society Washington, DC, 1995.
- [159] Peter NEMES, Ioan MARGINEAN et Akos VERTES : Spraying mode effect on droplet formation and ion chemistry in electrosprays. *Analytical Chemistry*, 79(8):3105–3116, 2007.

- [160] AP BRUINS, TR COVEY et JD HENION : Ion spray interface for combined liquid chromatography / atmospheric pressure ionization mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59(22):2642–2646, 1987.
- [161] RD VOYKSNER et H LEE : Investigating the use of an octupole ion guide for ion storage and high-pass mass filtering to improve the quantitative performance of electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 13(14):1427–1437, 1999.
- [162] JA LOO, CG EDMONDS et RD SMITH : Tandem mass-spectrometry of very large molecules - serum-albumin sequence information from multiply charged ions formed by electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, 63(21):2488–2499, 1991.
- [163] R LUDWIG : Water : From clusters to the bulk. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(10):1808–1827, 2001.
- [164] JM HEADRICK, EG DIKEN, RS WALTERS, NI HAMMER, RA CHRISTIE, J CUI, EM MYSHAKIN, MA DUNCAN, MA JOHNSON et KD JORDAN : Spectral signatures of hydrated proton vibrations in water clusters. *Science*, 308(5729):1765–1769, 2005.
- [165] M SULPIZI, G FOLKERS, U ROTHLSBERGER, P CARLONI et L SCAPOZZA : Applications of density functional theory-based methods in medicinal chemistry. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 21(2):173–181, 2002.
- [166] NJ SINGH, M PARK, SK MIN, SB SUH et KS KIM : Magic and antimagic protonated water clusters : Exotic structures with unusual dynamic effects. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45(23):3795–3800, 2006.
- [167] J SAUER et J DOBLER : Gas-phase infrared spectrum of the protonated water dimer : Molecular dynamics simulation and accuracy of the potential energy surface. *Chemphyschem*, 6(9):1706–1710, 2005.
- [168] KR ASMIS, NL PIVONKA, G SANTAMBROGIO, M BRUMMER, C KAPOSTA, DM NEUMARK et L WOSTE : Gas-phase infrared spectrum of the protonated water dimer. *Science*, 299(5611):1375–1377, 2003.
- [169] TD FRIDGEN, TB MCMAHON, L MACALEESE, J LEMAIRE et P MAITRE : Infrared spectrum of the protonated water dimer in the gas phase. *Journal Of Physical Chemistry A*, 108(42):9008–9010, 2004.
- [170] JW SHIN, NI HAMMER, EG DIKEN, MA JOHNSON, RS WALTERS, TD JAEGER, MA DUNCAN, RA CHRISTIE et KD JORDAN : Infrared signature of structures associated with the $\text{h}^+(\text{h}_2\text{o})(n)$ ($n=6$ to 27) clusters. *Science*, 304(5674):1137–1140, 2004.
- [171] TS ZWIER : The structure of protonated water clusters. *Science*, 304(5674):1119–1120, 2004.
- [172] MM SHAHIN : Mass-spectrometric studies of corona discharges in air at atmospheric pressures. *Journal Of Chemical Physics*, 45(7):2600–2605, 1966.
- [173] M PAVLIK et JD SKALNY : Generation of $[\text{h}_3\text{o}]^+(\text{h}_2\text{o})(n)$ clusters by positive corona discharge in air. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 11(16):1757–1766, 1997.
- [174] Kasper DRENCK, Preben HVELPLUND, Steen Brondsted NIELSEN, Subhasis PANJA et Kristian STOCHKEL : On the formation and fragmentation of nitrate in mixed clusters using atmospheric pressure corona discharge in air. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 273(3):126–131, 2008.

- [175] R.J. COLTON : *Procedures in scanning probe microscopies*. Wiley New York, 1998.
- [176] DJ WALES et MP HODGES : Global minima of water clusters (h₂o)(n), n ≤ 21, described by an empirical potential. *Chemical Physics Letters*, 286(1-2):65–72, 1998.
- [177] SS IYENGAR, MK PETERSEN, TJF DAY, CJ BURNHAM, VE TEIGE et GA VOTH : The properties of ion-water clusters. i. the protonated 21-water cluster. *Journal Of Chemical Physics*, 123, 084309(8), 2005.
- [178] Robin TUYTTEN, Filip LEMIERE, Eddy L. ESMANS, Wouter A. HERREBOUT, Benjamin J. van der VEKEN, Ed DUDLEY, Russell P. NEWTON et Erwin WITTERS : In-source cid of guanosine : Gas phase ion-molecule reactions. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 17(8):1050–1062, 2006.
- [179] NB CECH et CG ENKE : Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6):362–387, 2001.
- [180] DR ZOOK et AP BRUINS : On cluster ions, ion transmission, and linear dynamic range limitations in electrospray (ionspray) mass spectrometry. *International Journal Of Mass Spectrometry And Ion Processes*, 162(1-3):129–147, 1997.
- [181] SA SHAFFER, A TOLMACHEV, DC PRIOR, GA ANDERSON, HR UDSETH et RD SMITH : Characterization of an improved electrodynamic ion funnel interface for electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 71(15):2957–2964, 1999.
- [182] SA SHAFFER, KQ TANG, GA ANDERSON, DC PRIOR, HR UDSETH et RD SMITH : A novel ion funnel for focusing ions at elevated pressure using electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 11(16):1813–1817, 1997.
- [183] T HIM, AV TOLMACHEV, R HARKEWICZ, DC PRIOR, G ANDERSON, HR UDSETH, RD SMITH, TH BAILEY, S RAKOV et JH FUTRELL : Design and implementation of a new electrodynamic ion funnel. *Analytical Chemistry*, 72(10):2247–2255, 2000.
- [184] AV TOLMACHEV, T KIM, HR UDSETH, RD SMITH, TH BAILEY et JH FUTRELL : Simulation-based optimization of the electrodynamic ion funnel for high sensitivity electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal Of Mass Spectrometry*, 203(1-3):31–47, 2000.
- [185] Yehia IBRAHIM, Keqi TANG, Aleksey V. TOLMACHEV, Alexandre A. SHVARTSBERG et Richard D. SMITH : Improving mass spectrometer sensitivity using a high-pressure electrodynamic ion funnel interface. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 17(9):1299–1305, 2006.
- [186] Yehia IBRAHIM, Mikhail E. BELOV, Aleksey V. TOLMACHEV, David C. PRIOR et Richard D. SMITH : Ion funnel trap interface for orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(20):7845–7852, 2007.
- [187] T KIM, HR UDSETH et RD SMITH : Improved ion transmission from atmospheric pressure to high vacuum using a multicapillary inlet and electrodynamic ion funnel interface. *Analytical Chemistry*, 72(20):5014–5019, 2000.
- [188] L TANG et P KERBARLE : Dependence of ion intensity in electrospray mass-spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical Chemistry*, 65(24):3654–3668, 1993.
- [189] CG ENKE : A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Analytical Chemistry*, 69(23):4885–4893, 1997.

- [190] R KOSTIAINEN et AP BRUINS : Effect of multiple sprayers on dynamic-range and flow-rate limitations in electrospray and ionspray mass-spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 8(7):549–558, 1994.
- [191] R. BOYD : Electrospray ionization mass spectrometry : Fundamentals, instrumentation, and applications. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 8(11):1191–1192, 1997.
- [192] KQ TANG, YH LIN, DW MATSON, T KIM et RD SMITH : Generation of multiple electrosprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity. *Analytical Chemistry*, 73(8):1658–1663, 2001.
- [193] M WILM et M MANN : Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry*, 68(1):1–8, 1996.
- [194] GS JACKSON et CG ENKE : Electrical equivalence of electrospray ionization with conducting and nonconducting needles. *Analytical Chemistry*, 71(17):3777–3784, 1999.
- [195] Vilmos KERTESZ et Gary J. VAN BERKEL : Expanded use of a battery-powered two-electrode emitter cell for electrospray mass spectrometry. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 17(7):953–961, 2006.
- [196] SL ZHOU et KD COOK : A mechanistic study of electrospray mass spectrometry : Charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 12(2):206–214, 2001.
- [197] NB CECH, JR KRONE et CG ENKE : Predicting electrospray response from chromatographic retention time. *Analytical Chemistry*, 73(2):208–213, 2001.
- [198] RB COLE et JH ZHU : Chloride anion attachment in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 13(7):607–611, 1999.
- [199] R SAF, C MIRTL et K HUMMEL : Electrospray mass-spectrometry using potassium-iodide in aprotic organic-solvents for the ion formation by cation attachment. *Tetrahedron Letters*, 35(36):6653–6656, 1994.
- [200] CL LIU, DC MUDDIMAN, KQ TANG et RD SMITH : Improving the microdialysis procedure for electrospray ionization mass spectrometry of biological samples. *Journal Of Mass Spectrometry*, 32(4):425–431, 1997.
- [201] GJ VAN BERKEL, JME QUIRKE, RA TIGANI, AS DILLEY et TR COVEY : Derivatization for electrospray ionization mass spectrometry. 3. electrochemically ionizable derivatives. *Analytical Chemistry*, 70(8):1544–1554, 1998.
- [202] VE VANDELL et PA LIMBACH : Electrospray ionization mass spectrometry of metalloporphyrins. *Journal Of Mass Spectrometry*, 33(3):212–220, 1998.
- [203] BL FREY, Y LIN, MS WESTPHALL et LM SMITH : Controlling gas-phase reactions for efficient charge reduction electrospray mass spectrometry of intact proteins. *Journal Of The American Society For Mass Spectrometry*, 16(11):1876–1887, 2005.
- [204] MH AMAD, NB CECH, GS JACKSON et CG ENKE : Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. *Journal Of Mass Spectrometry*, 35(7):784–789, 2000.
- [205] U BAHR, A PFENNINGER, M KARAS et B STAHL : High sensitivity analysis of neutral underivatized oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 69(22):4530–4535, 1997.

-
- [206] M KARAS, U BAHR et T DULCKS : Nano-electrospray ionization mass spectrometry : Addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius Journal Of Analytical Chemistry*, 366(6-7):669–676, 2000.
- [207] ZR WU, WQ GAO, MA PHELPS, D WU, DD MILLER et JT DALTON : Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(3):839–847, 2004.

Étude de la fragmentation de molécules d'intérêt biologique isolées et nano-solvatées induite par collision avec des ions multichargés et des particules neutres

RÉSUMÉ

Cette thèse est une étude de la fragmentation en phase gazeuse de molécules d'intérêt biologique soumises à des collisions avec des ions multichargés de basse énergie (énergie cinétique de quelques keV) et des atomes alcalins ou de gaz rare. L'objectif est d'étudier les processus physique qui conduisent à la dissociation de ces systèmes soumis à une excitation électronique intense. Afin de mettre en évidence les propriétés intrinsèques de certaines biomolécules (porphyrines et acides aminés), des expériences sur des systèmes isolés ont été effectuées. Les résultats obtenus rendent compte de la grande stabilité des porphyrines lors de l'arrachement ou de l'attachement d'électrons. La dépendance des voies de fragmentation induite par les ions multichargés en fonction de l'isomérisation de l'alanine a été démontrée. Dans un second temps, la prise en compte d'un environnement modèle autour des biomolécules a mis en évidence l'apparition ou la modification des voies de dissociation provoquée par la présence d'autres molécules biologiques (agrégats de bases nucléiques) ou de molécules de solvant (eau, méthanol, acétonitrile) autour de la biomolécule étudiée. Enfin dans le but de poursuivre ces études avec des systèmes de plus grande taille, un nouveau dispositif expérimental, développé durant la thèse et basé sur une source electrospray et un quadripôle de sélection en masse, est présenté. Les tests réalisés avec ce dispositif et les améliorations proposées permettent d'envisager, à l'avenir, des études sur la dynamique de fragmentation de grands systèmes biomoléculaires chargés et hydratés provoquée par des ions multichargés de basse énergie.

Fragmentation study of isolated and nanosolvated biomolecules induced by collision with multiply charged ions and neutral particles

ABSTRACT

This thesis concerns a gas phase study of the fragmentation of biomolecular systems induced by slow collisions with multiply charged ions (in the keV-region), alkali atoms and rare gases. The main objective was to study the physical processes involved in the dissociation of highly electronically excited systems. In order to elucidate the intrinsic properties of certain biomolecules (porphyrins and amino acids) we have performed experiments in the gas phase with isolated systems. The obtained results demonstrate the high stability of porphyrins after electron removal and attachment. Furthermore, a dependence of the fragmentation pattern produced by multiply charged ions on the isomeric structure of the alanine molecule has been shown. In a second part of the thesis, a strong influence of the environment of the biomolecule on the fragmentation channels, their modification and their new opening, has been clearly proven. This phenomenon occurs in the presence of other surrounding biomolecules (clusters of nucleobases) as well as for molecules of a solvent (molecules of water, methanol and acetonitrile) in which the biomolecule is embedded. In order to extend these studies to larger systems, a new experimental set-up, based on an electro-spray ion source combined with a quadrupole mass filter has been developed. Due to the successful tests and proposed improvements of the device future experiments will become available concerning the fragmentation of large charged and solvated biomolecular systems induced by collision processes.

MOTS-CLES

Spectrométrie de masse avec ionisation electrospray, Biomolécules, Interactions ion-molécule, Dommages dus aux collisions, Acides aminés, Nucléotides, Clusters, Hydratation

DISCIPLINE

Milieux dilués et optique fondamentale

LABORATOIRE

CIMAP - GANIL

Centre de Recherche sur les Ions, les Matériaux et la Photonique

Boulevard Henry Becquerel, BP 5133, 14070 Caen, Cedex 05, France